

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE  
ERITROPOYETINA COMO FACTOR  
PRONÓSTICO DEL CARCINOMA DE  
CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA**

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID REGISTRO GENERAL
Entrada 01 Nº. 200500019859 14/11/05 13:51:54

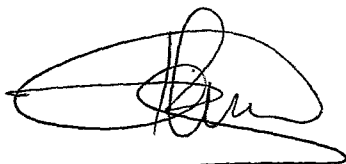


*Reg. F.M. 25510*

**Francisco Antonio Bernabeu Andreu**

**Madrid, 2005**

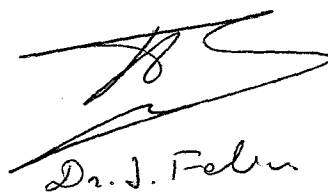
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de Sobresaliente cum laude  
Madrid, 16-12-05



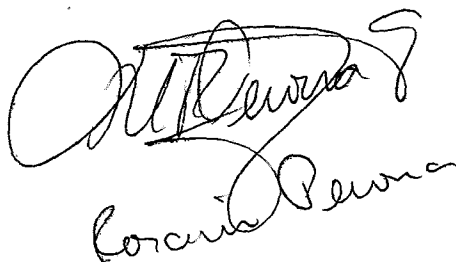
Paloma Cejas.



J. Gabriel Canales



Dr. J. Felín



Corina Peña



Ana Romero

**A mis padres: Paco y Mari Paz**

## AGRADECIMIENTOS

Al. Profesor **Manuel González Barón** por su magisterio tanto en la Oncología como en casi todos los aspectos de la vida. También por su estímulo constante para llevar a buen término esta tesis y otros muchos y diversos proyectos.

Al Dr. **Cristobal Belda Iniesta**, por sus enseñanzas y su dedicación a lo largo de toda la realización de esta tesis. En él se mezclan el entusiasmo por el conocimiento y el profundo bagaje científico que atesora.

Al Dr. **Javier Alves Ferreira** , por su amable y rigurosa aportación en el terreno de la inmunohistoquímica.

A los Dres. **R. Madero** y **E. Pérez-Bustamante**, de la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz, por su aportación al análisis estadístico de los resultados.

A todos los compañeros del Equipo Directivo del Hospital Universitario La Paz, con los que he tenido y tengo el honor de compartir labores de Gestión, por su ayuda y colaboración desinteresada en la consecución de esta tesis.

A todo el personal del Hospital Universitario La Paz que me han brindado su amistad y apoyo en todo momento.

Al Dr. **Apolinar Rodríguez Albariño**, que fue la espoleta que desencadenó y propició el comienzo de este trabajo.

A **Pablo**, mi hijo, que cada día me recuerda que merece la pena luchar por el futuro de los que nos siguen.

A **Merche**, mi compañera, por su infatigable aliento y su convicción en que el final llegaría. .

A **mis padres**, que con un profundo cariño y una tremenda paciencia, desde tiempo in memorial han insistido, suave pero tenazmente en que realizara la tesis doctoral.



## ÍNDICE

1 – INTRODUCCIÓN.....	5
- ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	8
- EL CARCINOMA DE VEJIGA: UNA VISIÓN GLOBAL COMO ENTIDAD CLÍNICO-PATOLÓGICA.....	13
- CARCINOMA SUPERFICIAL DE VEJIGA.....	13
- CARCINOMA INVASIVO DE VEJIGA.....	17
- UNA APROXIMACIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA.....	23
o Alteraciones en el ciclo celular.....	29
o Apoptosis.....	43
- EL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA.....	46
o La señalización intracelular asociada a EPOR.....	47
o Regulación de la expresión de EPOR.....	52
o Función biológica de EPOR y sus implicaciones en cáncer.....	52
2 - HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	56
3 - MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
4 – RESULTADOS.....	74
5 – DISCUSIÓN.....	110
6 – RESUMEN.....	138
7 – CONCLUSIONES.....	142
8 – BIBLIOGRAFÍA.....	145
9 – ÍNDICE DE FIGURAS.....	176
10 – ÍNDICE DE TABLAS.....	177

## 1.- INTRODUCCIÓN

El carcinoma de vejiga representa aproximadamente el 2% de todos los tumores malignos y es el segundo tumor más frecuente del sistema urinario (1). La vejiga es la localización más frecuente de las neoplasias uroteliales del tracto urinario (90%) (2). Ello da como resultado que el carcinoma de vejiga sea responsable de más de 140.000 muertes anuales (3).

La incidencia, morbilidad y mortalidad varían en función de una diversidad de factores tales como la zona geográfica de residencia, la raza, el sexo y la edad entre otros. Así, la incidencia es mayor en países industrializados y dentro de ellos en áreas urbanas, dando crédito a los efectos de los carcinógenos industriales. El número de casos de carcinoma de vejiga está aumentando en Occidente mientras que la mortalidad no ha variado o disminuye ligeramente (4). Por ejemplo, en Estados Unidos ha disminuido el número de muertes en los últimos años. En el año 2000 se diagnosticaron más de 54.000 nuevos casos y murieron más de 12.000 por esta causa, lo que supone el cuarto lugar en incidencia en varones y el octavo en mujeres. La mortalidad ocupa el noveno lugar ya que en muchas ocasiones se trata de un tumor curable. En Europa la incidencia ocupa el quinto lugar en varones y el decimoquinto en mujeres. En España la incidencia se sitúa en quinto lugar, tras los de pulmón, mama, colorrectal y estómago. En relación con la mortalidad ocupa el séptimo lugar, después de los de estómago, pulmón, próstata, colorrectal, útero y mama (5).

El área de residencia influye además en la frecuencia de aparición de los diferentes tipos histológicos. Así en Europa y Estados Unidos la variedad más frecuente es el carcinoma de células transicionales y en el norte de África la histología más común es la epidermoide (6). En los países occidentales la

frecuencia de las variedades transicionales es casi el doble en la raza caucasiana (17,7 por 100.000 habitantes) frente a razas provenientes de África (9,2 por 100.000 habitantes). Aunque la frecuencia de aparición es inferior en varones negros que en blancos, el ratio de mortalidad es similar en ambos, por lo que probablemente el retraso en el diagnóstico juegue un papel importante (3). Entre 1990 y 1997 la incidencia ajustada a la edad para hispanos fue de 8,0 por 100.000, para asiáticos de 7,5 por 100.000 y para indios americanos de 2,6 por 100.000.

En relación con el sexo, la frecuencia es muy superior en hombres (28,2 por 100.000 habitantes) frente a mujeres (7,5 por 100.000 habitantes), aun cuando esta proporción se está igualando rápidamente como consecuencia del incremento del hábito tabáquico en este grupo de riesgo (3). La mortalidad por carcinoma de vejiga es proporcionalmente mayor en mujeres que en hombres, probablemente por el retraso diagnóstico de esta neoplasia en mujeres. Esta circunstancia se reproduce en la mayoría de las neoplasias humanas asociadas al tabaquismo. Sin embargo, los varones constituyen las dos terceras partes de todas las muertes por estas neoplasia con tasas ajustadas de 3,2/100.000.

La edad es un importante factor de riesgo para el diagnóstico de esta neoplasia. En este sentido la incidencia en mayores de 65 años es de 110 casos por 100.000 habitantes mientras que en sujetos más jóvenes apenas alcanza el 6,5 por 100.000. Así pues, un paciente de 70 años tiene un riesgo tres veces superior de padecer esta enfermedad que un individuo que pertenezca a un grupo de edad que oscile entre los 50 y los 69 años de edad, y

15 a 20 veces más que aquellos con edades comprendidas entre los 30 y los 54 años (7).

En cuanto a la topografía es de destacar que las localizaciones más frecuentes son las paredes posterior y laterales, seguidas de los orificios ureterales, trígono, cuello y cúpula (2).

## ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

Las causas del carcinoma de vejiga pueden clasificarse en exógenas o ambientales y endógenas o genéticas.

Así, se han llevado a cabo múltiples estudios epidemiológicos tendentes a esclarecer tanto los factores de riesgo exógenos más importantes como su mecanismo de acción (8). Si bien, como veremos más adelante, algunas de las causas más importantes del cáncer de vejiga se conocen desde hace décadas, tales como fumar cigarrillos, exposición ocupacional e infecciones crónicas con *Schistosoma haematobium*, existe actualmente cierta controversia en cuanto a la influencia de la dieta y del consumo de líquidos en el riesgo de padecer esta enfermedad. En 1986 comenzó el estudio Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS) (9) y hasta la fecha se han publicado multitud de artículos que describen la correlación entre el tabaco, el consumo de bebidas y la dieta con el cáncer de vejiga (10- 15). En cuanto a la fracción etiológica, el tabaquismo por cigarrillos es el responsable del 50% de todos los carcinomas de vejiga de los varones y del 25% de las mujeres (16). Es, por tanto, la causa más importante. En este sentido, la exposición a aminas aromáticas tras la inhalación del humo del tabaco y su posterior excreción urinaria es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia. Así, el

hábito tabáquico incrementa hasta en tres órdenes de magnitud el riesgo de padecer un carcinoma de vejiga (15). El riesgo desciende tras la abstinencia tabáquica hasta un 40% tras 4 años.

El mecanismo exacto por el que fumar cigarrillos provoca cáncer de vejiga aún no se ha establecido, aunque se cree que el aumento de riesgo se debe al gran número de compuestos químicos presentes en el humo: 2-naftilamina y 4-aminobifenilo. Además se ha demostrado que fumar cigarrillos provoca hiperplasia del epitelio de la vejiga (17).

La actividad laboral ha ocupado el segundo lugar tras el tabaco como importante factor de riesgo del cáncer de vejiga. En artículos publicados a principios de los 90 (18) se estimaba que las exposiciones ocupacionales eran la causa de un 20% del total de cánceres de vejiga. De nuevo la exposición a aminas aromáticas (benzidina, 4-aminobifenilo, 4-cloro-o-toluidina,  $\beta$ -naftialmina), citadas en el efecto del tabaco, son los únicos agentes específicos que se han asociado inequívocamente al cáncer en profesiones como la manufactura de tintes, de pegamentos y otras industrias. Frecuentemente se han observado riesgos incrementados entre los pintores, maquinistas, procesadores del aluminio y otros metales, trabajadores de la industria textil, trabajadores del cuero y zapateros, impresores, peluqueros y transportistas.

Entre las causas ambientales descritas se incluyen los venenos arseniales (descritos en Argentina, Chile y Bangla-Desh) (19) y la nefropatía de los Balcanes (20). En Taiwan se ha asociado la aparición de las neoplasias vesicales a una patología vascular inducida por arsénico denominada síndrome del pie negro. Las causas infecciosas oscilan entre la esquistosomiasis (bilharzia) (16) y las infecciones crónicas (21) asociadas a la disfunción

neurógena crónica de ciertas patologías debilitantes. En este sentido, el *Schistosoma haematobium* (3) se asocia al desarrollo de carcinomas epidermoide en pacientes jóvenes, probablemente por irritación crónica y por interferir con el metabolismo local de los mutágenos derivados del tabaco. Finalmente, el tratamiento con ciclofosfamida (22), habitual en la terapia de muchas neoplasias, y la radioterapia pélvica son también factores predisponentes (23).

En la tabla 1 vienen resumidos los resultados de los múltiples estudios que han demostrado o sugerido las causas exógenas descritas y otras que podrían influir en el desarrollo del carcinoma de vejiga.

En relación con el influjo genético que sobre el desarrollo del carcinoma de vejiga imprimen diversos factores, Phasos (3) sugiere que el cáncer de vejiga es tres a cinco veces más frecuente en hombres que en mujeres y que los hombres tienen mayor predisposición a desarrollar un carcinoma de vejiga que las mujeres, probablemente debido a un importante papel de diversos factores genéticos. Por el contrario Pelucchi y colaboradores (24) confirman que el principal factor de riesgo para el cáncer de vejiga es el consumo de tabaco y que a igualdad de dosis y tiempo de exposición no hay diferencias entre hombres y mujeres. De hecho el número de cánceres de vejiga en mujeres italianas ha pasado del 17% al 26% entre 1995 y 2002, lo que refleja el aumento del consumo de tabaco. En cuanto al posible papel protector hormonal en la mujer frente al cáncer de vejiga no existen resultados concluyentes.

La mayoría de los estudios epidemiológicos están orientados al análisis de factores ambientales. Sin embargo es muy útil el estudio combinado de

**TABLA 1 – Niveles de evidencia y de correlación de diversos factores de riesgo (exposición vs no exposición) del cáncer de vejiga**

Evidencia	Irrefutable	Probable	Posible
Riesgo notablemente aumentado	Fumar cigarrillos	—	—
Riesgo moderadamente aumentado	—	—	—
Riesgo ligeramente aumentado	Consumo de alcohol	—	Fumar puros. Fumar en pipa. Fumadores pasivos
No correlación	—	Consumo de café Consumo de té Consumo de vegetales Ingesta de vitamina A y carotenoides Ingesta de vitamina C	Ingesta de fluidos en general  Ingesta de folato
Riesgo ligeramente disminuido	—	Ingesta de frutas	—
Riesgo moderadamente disminuido	—	Ingesta de selenio	Ingesta de vitamina E
Riesgo notablemente disminuido	—	—	—



dichos factores con factores genéticos. Así se conoce que los polimorfismos de N-acetiltransferasa 2 (NAT2) o carencia de glutathion S-transferasa M1 (GSTM1) pueden alterar el metabolismo de los carcinógenos del tabaco. Además, la enzima debrisoquina hidroxilasa, codificada por el gen CYP2D6, está implicada en el metabolismo de la nicotina. La aril hidroxilasa, enzima codificado por el gen CYP1A1 (uno de los genes del citocromo P450) puede estar implicada en la activación metabólica de los arilhidrocarburos policíclicos. El estudio de interacciones polimorfismos-ambiente, haría posible identificar a individuos con mayor susceptibilidad que la población general a cáncer tras exponerse a carcinógenos potenciales.

También se ha encontrado relación entre ciertos factores de riesgo y la morfología e invasividad del tumor. Así el efecto protector del nivel de selenio y del consumo de frutas se reducía fundamentalmente a los carcinomas de células transicionales invasivos, independientemente de la morfología del tumor (10)(14), sin embargo no existe asociación entre consumo de cigarrillos y alcohol y la invasividad y morfología del tumor (13) (15). Sería de gran interés investigar la asociación entre factores de riesgo ambientales específicos y mutaciones específicas que conduzcan a diferentes morfologías e invasividades de los cánceres de vejiga.

## EL CARCINOMA DE VEJIGA: UNA VISIÓN GLOBAL COMO ENTIDAD CLÍNICO-PATOLÓGICA.

El 90% de los tumores uroteliales vesicales son carcinomas de células transicionales. Generalmente son papilares y multicéntricos, observándose con frecuencia tumores en distinto periodo evolutivo en un mismo paciente.

El carcinoma escamoso o epidermoide representa un 6-8% de los tumores vesicales y el adenocarcinoma, un 2-5%. Otros tipos de tumores (carcinosarcoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoide y sarcomas de partes blandas entre otros) son raros.

Los carcinomas transicionales de vejiga se dividen en dos grupos (25), con diferente historia natural: los superficiales y los invasivos.

El carcinoma superficial de vejiga se define como una neoplasia epitelial maligna confinada a las dos capas más superficiales que configuran la vejiga humana: el urotelio y la lámina propia. Una vez que el tumor ha atravesado la capa muscular se considera invasivo.

### CARCINOMA SUPERFICIAL DE VEJIGA

El carcinoma superficial de vejiga constituye un grupo de tumores con una enorme heterogeneidad clínica. Por un lado, los pacientes con tumores papilares de bajo grado tienen una gran tendencia a la recurrencia pero es rara su implicación como factor de riesgo para el desarrollo de tumores invasivos que comprometan la vida del paciente a medio plazo. Por el contrario, los pacientes con tumores de alto grado tienen una gran probabilidad de recurrencia invasiva o metastásica, con claras implicaciones de mal pronóstico a medio plazo. Así, se han diseñado diversos tipos de tratamientos en función

del riesgo de recurrencia y muerte, adaptando la agresividad del tratamiento a cada situación concreta. Por ejemplo, los tratamientos más agresivos se asocian a una mayor supervivencia a los 5 años frente a aquellos que conservan la vejiga en tumores de mal pronóstico tales como los de alto grado. Sin embargo, si aplicáramos estos tratamientos a todo paciente con un tumor no invasivo de alto riesgo estaríamos sobre-tratando a un 50% de estos pacientes, con unas consecuencias sobre la calidad de vida que podrían considerarse como inaceptables. Todo esto implica que es necesario el desarrollo de nuevos métodos que nos permitan realizar una predicción más concreta de la evolución a medio plazo en este grupo de pacientes.

Las técnicas actuales para predecir el pronóstico a medio plazo están fundamentadas sobre análisis histopatológicos e incluyen el grado tumoral, la invasión de la lámina propia y la presencia de carcinoma in situ. Los pacientes con alto riesgo de recurrencia por la presencia de un tumor de alto grado o con invasión de la lámina propia tienen una probabilidad del 50% de presentar una recurrencia invasiva del 50%. Así, podríamos afirmar que el tratamiento de los cánceres superficiales de vejiga consiste básicamente en la resección transuretral del tumor seguida o no por quimioterapia o inmunoterapia, conservando de esta forma la vejiga (26). Por otro lado, el tratamiento de los pacientes con alto riesgo de recidiva y progresión permanece controvertido. Por ello existen opiniones que por un lado sugieren la cistectomía radical (23) frente a sugerencias más conservadoras que recomiendan el tratamiento adyuvante intravesical, reservando la cistectomía solo para los casos en que fracase esta terapia inicial (27).

Actualmente, la inmunoterapia intravesical con bacilo de Calmett -Guerin (BCG) es la terapia más efectiva en términos de reducción de la mortalidad global (28), probablemente por su alta tasa de respuestas locales (29). En un metaanálisis sobre 24 estudios realizado por Sylvester (30), se estudió el efecto del tratamiento intravesical con BCG sobre la progresión del cáncer. Tras un seguimiento medio de hasta 30 meses, con un máximo de 15 años, el 9,8% (260/2658) de los pacientes tratados con BCG desarrolló una neoplasia invasiva. En el grupo control, con resección transuretral pero con o sin tratamiento intravesical, la tasa de progresión fue 13,8% (304/2205). La tasa de progresión en pacientes tratados con BCG fue un 27% más baja ( $p=0,001$ ) que en el grupo control. El metaanálisis también demostró que la tasa de progresión solo disminuía cuando se aplicaba un protocolo de mantenimiento de BCG. Con dicho protocolo la tasa de progresión incluso disminuía en un 37% ( $p=0,0001$ ).

Por el contrario, la quimioterapia intravesical ha demostrado que es capaz de ampliar el tiempo hasta la recurrencia pero no el índice de recurrencias invasivas o la mortalidad global, por lo que debe ser considerada por ahora como tratamiento de segunda elección. En este sentido, existen 23 ensayos controlados con placebo en los que estaban incluidos 4500 pacientes. En ellos se comparaba la resección con y sin quimioterapia intravesical (31). Los estudios varían considerablemente en cuanto a parámetros tales como criterios de inclusión, protocolos de tratamiento, seguimiento y métodos de análisis de los datos. Los resultados acumulativos de todos estos estudios muestran una disminución (15%) a corto plazo en la tasa de recurrencia del tumor cuando se administraba quimioterapia adyuvante tras la resección



transuretral. Once de estos ensayos incluían datos sobre la progresión y en ninguno de ellos se encontró diferencias estadísticamente significativas.

Uno de los ensayos más importantes hasta la fecha fue realizado por la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y el Medical Research Council (MRC) (32). En lo concerniente a profilaxis encontraron que la tasa de recurrencia a corto plazo (2-3 años) era un 14% más baja con quimioterapia intravesical adyuvante que en controles. La protección a largo plazo de la recurrencia fue más difícil de calcular, pero se estimó en un 7%. No se probó ningún efecto sobre la progresión.

Es posible que la asociación con de la quimioterapia intravesical con hipertermia (33), (34) o el cronograma de administración influyan en los resultados a largo plazo de este tratamiento adyuvante (31), (35-40). Por último destacaremos que el papel de la terapia de mantenimiento sigue siendo controvertido. Los estudios prospectivos con quimioterapia no han demostrado diferencias en el intervalo libre de recurrencia ni en la recurrencia a largo plazo cuando se comparaban con aquellos sin quimioterapia (41)(42).

Se han realizado estudios randomizados comparando BCG con tiotepa, doxorrubicina o mitomicina C. Los estudios con tiotepa o doxorrubicina han demostrado que BCG es superior (43). Entre los múltiples estudios realizados para comparar mitomicina C con BCG, ninguno de ellos obtuvo resultados tan concluyentes como con otros agentes quimioterápicos. Algunos ensayos incluían categorías de todos los riesgos, mientras que otros solo incluían pacientes de alto riesgo. La mayoría de los trabajos incluían pacientes con carcinoma in situ pero generalmente en escaso número.

Actualmente se está analizando el papel que tienen fármacos tales como la valrubicina (44), la pirarrubicina (45) y la gemcitabina (46) como tratamiento intravesical adyuvante, aun cuando los resultados a medio plazo impiden una definición concreta de sus indicaciones.

En general la quimioterapia intravesical reduce la recurrencia en pacientes con cáncer superficial de vejiga, pero no tiene efectos sobre la progresión ni sobre la supervivencia (47) (32) por lo que se debe considerar la instilación con BCG como tratamiento estándar tras la resección transuretral.

### CARCINOMA INVASIVO DE VEJIGA

A pesar del control efectivo de la radioterapia y de la cistectomía, aproximadamente el 50% de pacientes con cáncer de vejiga invasivo y clínicamente localizado mueren de su enfermedad. Además, un número significativo de pacientes es diagnosticado en esta fase de la enfermedad.

La cistectomía es el tratamiento estándar en Norte América y Europa para los cánceres invasivos localizados de vejiga. La cistectomía radical (con linfadenectomía) está especialmente indicada para pacientes con estadios T2-4N0M0 . Cuando los pacientes tienen afectación ganglionar en la pelvis o metástasis distantes esta actitud terapéutica no puede ofrecer la curación, por lo que debe integrarse en un protocolo de tratamiento multidisciplinario. Sin embargo los síntomas de la enfermedad avanzada tales como intensa hematuria, dificultad en la micción, urgencia y dolor en la micción, a menudo provocan importantes deterioros en la calidad de vida de los pacientes y un tratamiento opcional es la cistectomía paliativa.

La cistectomía radical implica la extirpación en bloque de la vejiga, la grasa perivesical y las cadenas linfáticas pélvicas. En hombres supone además la exéresis de la próstata y las vesículas seminales y en mujeres de la uretra, el útero, los ovarios y la pared anterior de la vagina. No obstante, hay varios riesgos en este procedimiento estándar: En primer lugar, no todos los pacientes son susceptibles del mismo, a causa de la propia naturaleza invasiva de la cirugía. Además la cirugía está generalmente contraindicada en pacientes con enfermedad cardiovascular. Y lo que es más importante, hay un grupo de pacientes en los que el posible beneficio de la cirugía por sí sola no resulta evidente.

Una reciente opción quirúrgica en hombres es la cistectomía con conservación de próstata, que consiste en una cistectomía con reconstrucción mediante una vejiga ileal, anastomosada a la próstata. Vallancien et al (48) estudiaron 100 casos de cistectomías conservadoras de próstata. La tasa de supervivencia específica del cáncer a los 5 años fue del 90% en tumores de estadio pT1 o menores, del 73% en tumores pT2 y del 63% en tumores pT3. Las recurrencias locales fueron escasas. Al año de seguimiento 86 de los 88 pacientes fueron continentes (97%). De los 61 pacientes con adecuada funcionalidad sexual previa, 50 (82%) mantuvieron la potencia con eyaculación retrógrada secundaria a resección transuretral, 6 (10%) tuvieron potencia parcial y 5 (8,1%) fueron impotentes.

Se estudió retrospectivamente la tasa de supervivencia tras la cistectomía radical tradicional con disección bilateral de nódulos linfáticos pélvicos (49). Los pacientes se dividieron en tres grupos: pacientes con tumor órgano-confinado ( $\leq$  PT3a), pacientes sin afectación ganglionar y pacientes con

tumores no órgano-confinados ( $\geq pT3b$ ). Las tasas de supervivencia específica de la enfermedad a los 10 años y total en los 3 grupos citados fueron de 72,9 frente a 49,1%, de 61,7 frente a 40,8% y de 33,3 frente a 22,8% respectivamente. En pacientes con afectación ganglionar, las tasas de supervivencia específica de la enfermedad a los 10 años y la total fueron 27,7 y 20,9% respectivamente.

En un análisis multivariante, el confinamiento al órgano y el estatus de afectación ganglionar fueron las variables independientes más potentes como predictores de supervivencia específica de la enfermedad en todas las categorías de pacientes. Solo la quimioterapia y el número de ganglios linfáticos afectados fueron significativamente correlacionados con la mortalidad de cánceres de células transicionales (50). La probabilidad de muerte debida a la enfermedad fue 2,1 veces menor ( $p=0,005$ ) en pacientes con quimioterapia y todos los ganglios linfáticos positivos adicionales aumentaron el riesgo de muerte de carcinoma de células transicionales en un 20% ( $p<0,001$ ). El punto de corte óptimo para predecir la muerte por carcinoma de células transicionales fue de 5 o más ganglios linfáticos. El valor de la linfadenectomía y su influencia sobre el estatus del tumor se confirmó en 321 pacientes que se sometieron a una cistectomía radical curativa. El número medio de ganglios extirpados fue 14,3 (entre 1 y 46). Hubo una significativa correlación entre el número de ganglios linfáticos extirpados y la supervivencia libre de tumor en los tumores pT2 y pT3 y en pacientes sin metástasis en ganglionar.

Otro análisis multivariante reveló que la categoría pT ( $p<0,01$ ), la categoría pN ( $p<0,01$ ) y el número de ganglios linfáticos extirpados ( $p=0,04$ ) fueron los factores que más afectaron a la supervivencia. Se han publicado



multitud de artículos sobre el número de ganglios que deben ser examinados para establecer el estatus del tumor, quedando fijado en al menos 9. También se ha estudiado la ratio entre ganglios positivos y ganglios totales resecados como factor pronóstico. En cualquier caso se ha concluido la importancia del estatus ganglionar linfático y de aquí la necesidad de estandarizar el número de ganglios a disecar (34).

Existe no obstante el problema del correcto estadiaje de los tumores invasivos de vejiga. Puesto que la resección transuretral es el procedimiento estándar para detectar si el cáncer invade la capa muscular de la vejiga, la resección debe ser lo suficientemente profunda para llegar a la capa muscular, con la dificultad añadida de no saber la extensión exacta del tumor. Además, incluso cuando las muestras contienen tejido muscular de la vejiga, a veces está tan deteriorado por la propia resección que el patólogo no puede estadificar correctamente la pieza. Efectivamente, a menudo con la resección transuretral se infraestadian pacientes sin manifestaciones clínicas de enfermedad invasiva que posteriormente deben ser sometidos a cistectomía radical (51). Esto ocurre con bastante frecuencia en tumores T1G3 (52). Por ello, la resección profunda de todos los tumores visibles en la vejiga es la piedra angular del diagnóstico y tratamiento de los cánceres invasivos de vejiga.

Las técnicas de imagen como la tomografía computerizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son modalidades ampliamente utilizadas en el estadiaje de los tumores invasivos de vejiga, sin embargo no permiten estadificar de forma exacta el tumor. En concreto un tumor músculo-invasivo precoz no puede ser diferenciado de un tumor superficial ni por TC ni por RM.

Para este fin la resección transuretral es todavía el método más fiable. A medida que el tamaño del tumor es lo suficientemente grande para ser detectado por TC o RM el estadiaje es más fiable por estas técnicas. La exactitud diagnóstica de la TC oscila entre un 40 y un 92% y la de la RM es entre un 10 y un 30% mayor que la de la TC.

En términos de diagnóstico por imagen de ganglios linfáticos metastásicos, ambas modalidades alcanzan una exactitud semejante. Sin embargo, las ligeras alteraciones de los nódulos, que aparecen en el 10-30% de los tumores invasivos dependiendo de la extensión de la lesión primaria, no pueden ser detectados ni por TC ni por RM, ya que las tasas de falsos negativos alcanzan hasta el 40%.

Por su parte, la utilidad de la PET es limitada en oncología urológica debido a que el análogo radiactivo de la glucosa se excreta con la orina, por tanto es difícil diferenciar las lesiones en la vejiga y ganglios adyacentes (53), aunque sí puede ser útil en la detección de metástasis remotas, si bien la tasa de detección de afectación a distancia no supera el 67%

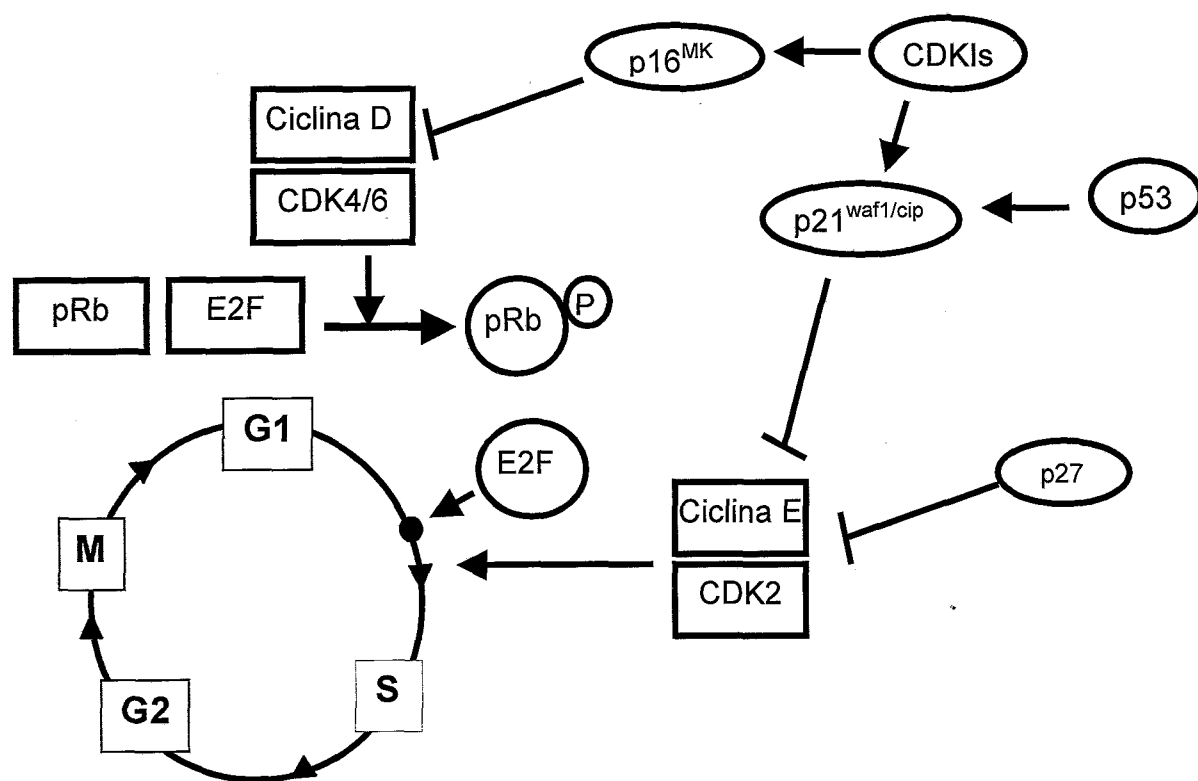
Existe controversia en cuanto al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, así hay artículos que abogan por una quimioterapia combinada, sin embargo no se demuestra que con ella haya una mejora de supervivencia. Algunos estudios proporcionan evidencia indirecta de que el tratamiento con gemcitabina-cisplatino y metotrexate-vinblastina-doxorrubicina-cisplatino (M-VAC) más factores estimulantes de colonias de granulocitos podría aportar un beneficio equivalente a MVAC y cisplatino-metotrexate-vinblastina (CMV) pero con menos toxicidad.

Se ha estudiado recientemente las diferencias entre la radioterapia radical y la cistectomía radical (54). La mortalidad asociada al tratamiento a los 30 y 90 días fue de 3,1 y 8,3% para cistectomía radical y de 0,3 y 1,65% para radioterapia. La mayor fuente de morbilidad tras cistectomía fueron las complicaciones gastrointestinales. Las tasas de supervivencia estuvieron en torno al 36-37% con ambas terapias, sin diferencias significativas entre ellas, lo que sugiere que ambas podrían ser consideradas como las opciones primarias de tratamiento del cáncer invasivo de vejiga.

## UNA APROXIMACIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA

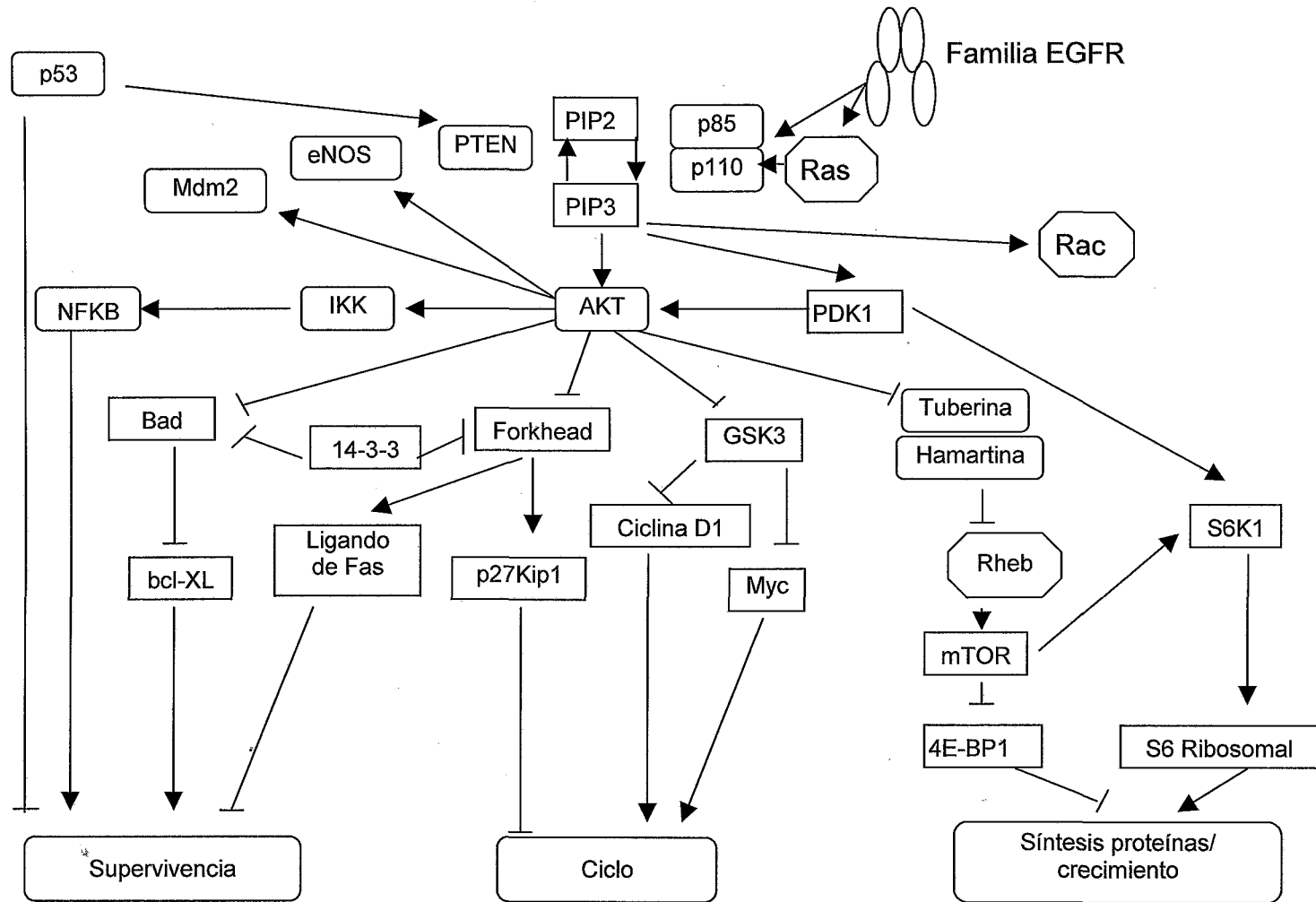
El carcinoma de vejiga es un modelo excepcional para el estudio de la progresión del cáncer y de las alteraciones que sucesivamente transforman a una neoplasia localizada en una entidad con capacidad de invadir localmente y de viajar a distancia. En este sentido no es infrecuente encontrarnos en la práctica clínica diaria a muchos pacientes con recidivas que progresivamente aumentan su grado de diferenciación y se transforman al cabo de unos años en tumores invasivos y metastásicos que finalmente conducen a la muerte del portador. Así, los primeros estudios identificaron una gran cantidad de anomalías cromosómicas, tanto en estructura como en número. Las aberraciones cromosómicas conducían a la génesis de productos de fusión o a cambios en la regulación de genes (por ej. sobreexpresión de ciertos genes) que tuvieran un impacto directo sobre la proliferación celular, sobre el control del ciclo celular (figura 1), o sobre la apoptosis (figuras 2 y 3). Por otro lado, la presencia de delecciones, duplicaciones, trisomías y monosomías, también podían modular la dosis génica de estructuras críticas para la regulación proliferativa de una célula. De acuerdo con la hipótesis de Knudson, los genes cuya función normal suprime el crecimiento son generalmente inactivados por un mecanismo en dos etapas: una copia es generalmente modulada y la otra eliminada. Por tanto, una pérdida consistente de regiones cromosómicas (delección) implicaba la existencia de genes supresores de tumores como dianas de esas delecciones. Diversos estudios genéticos realizados sobre neoplasias de vejiga han demostrado la delección de varios brazos cromosómicos, incluyendo 3p, 6q, 9q, 11p, 17p, y 18q. La pérdida de 9q se ha

**Fig. 1 - El ciclo celular y su regulación por ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), e inhibidores de CDKs (CKIs).** Como se indica, la ciclina D interactúa con CDK4 y CDK6 para conducir hacia la progresión de la célula a través de G1. La asociación de ciclina E con CDK2 activa la transición G1-S y dirige la entrada en la fase S. En su estado activo, Rb está hipofosforilado y forma un complejo con un grupo de factores de transcripción conocido como E2F. Cuando pRb se inactiva por fosforilación mediada por CDK2, CDK4 o CDK6, se liberan los factores de transcripción E2F, dando lugar a la activación de la transcripción de los genes esenciales para la progresión a la fase S. p53 puede, a través de p21, disminuir las actividades enzimáticas del complejo ciclina E-CDK2.





**Fig. 3.- Señalización de PI3K/AKT.** PI3K está implicada en el control del crecimiento, progresión y multiplicación de la célula tumoral a través de tres niveles, todos ellos mediados por AKT: Control de apoptosis, ciclo celular y de la síntesis de proteínas.



constatado tanto en tumores de vejiga de bajo grado como en los de alto grado, lo que sugiere que la pérdida de 9q puede ser un suceso muy primitivo en la génesis del cáncer de vejiga. Entre los cambios precoces que aparecen en los tumores superficiales están las deleciones de 11p y 8p y las fusiones de 8q y 1q (55). Por el contrario, las deleciones en 17p no fueron identificadas en lesiones superficiales papilares no invasivas, mientras que el 60% de los tumores invasivos exhibieron pérdida de heterozigosidad (LOH) de 17p, lo que sugería su implicación en la progresión del cáncer de vejiga (figura 4). Simon et al. analizaron mediante hibridación genómica comparativa 67 carcinomas de vejiga describiendo amplificaciones en 5p11-p13, 7q21-q31, 9p24 y 17q24-q25. Los tumores no-metastásicos presentaban más aberraciones sobre la media que los metastásicos, aunque no se apreció ningún cambio predominante en ningún grupo. Sus datos confirmaron hallazgos previos de gran similitud genética entre carcinomas de vejiga ligera y profundamente invasivos, mientras que la principal diferencia genómica se observó en muestras procedentes de especímenes metastásicos frente a no metastásicos (56). Se ha observado una asociación similar entre la LOH de 6q y 3p y la presencia de invasión vascular y afectación ganglionar. Además, se han descrito asociaciones entre deleciones de 4p y 17p y la formación de un isocromosoma de 5p y fenotipos tumorales más agresivos.

Sin embargo, en términos genómicos la gran revolución tecnológica que ha aportado el desarrollo de los microarrays de cDNA ha permitido la identificación y caracterización de multitud de regiones cromosómicas y sus correspondientes genes, que hasta ahora no se habían podido considerar como relevantes en las neoplasias vesicales. Entre sus limitaciones surge el





hecho asociado al pequeño tamaño de las muestras de tejido analizadas (diámetro de 0,6 mm), por lo que ciertos autores se han cuestionado la representatividad de las mismas sobre el conjunto del tumor. Sin embargo, Nocito et al (57) demostraron que la heterogeneidad del tumor no afecta significativamente a la capacidad de detectar correlaciones clínico-patológicas por parte de los microarrays. Estos autores partieron de un grupo de 2317 tumores de vejiga a los que previamente se les había determinado el grado histológico y el índice de proliferación mediante ki67. Se extrajo mRNA de diversas áreas de cada uno de estos tumores y de estas muestras se realizaron cuatro determinaciones con esta tecnología. Se pudo disponer de la información sobre el seguimiento de 1092 pacientes. A pesar de discrepancias en casos individuales, la información del grado y del ki67 obtenida desde las plataformas de microarrays y de las muestras convencionales fue similar ( $p < 0,0001$ ). Lo más importante es que todas las asociaciones que se observaron en las muestras convencionales el grado de diferenciación y el ki67 y el estadio o el pronóstico (recurrencia, progresión, supervivencia debida al tumor), pudieron ser completamente reproducidas en las 4 réplicas (57).

Todos estos resultados han permitido identificar nuevas áreas del genoma que en estudios posteriores han demostrado ser importantes para la progresión molecular de tumores de células transicionales. Las principales alteraciones descritas afectan a la regulación del ciclo celular y a la inducción de apoptosis.

#### Alteraciones en el ciclo celular

El gran número de estudios realizados durante los últimos años sobre los factores que controlan el ciclo celular, la proliferación celular y las rutas

apoptóticas ha proporcionado un creciente y progresivo entendimiento de los mecanismos patogénicos que llevan al cáncer. Tales factores incluyen, entre otros, el gen del p53 y del retinoblastoma (Rb) (figura 1), ambos identificados como genes supresores de tumores. Se ha descrito que p53 juega un papel en la protección de la integridad del DNA (figura 2), impidiendo la entrada en la fase S hasta que la lesión del DNA haya sido reparada y dirigiendo a determinadas células hacia la apoptosis (58). El gen del Rb también tiene un papel esencial en la regulación del checkpoint de transición G1/S del ciclo celular, permitiendo o evitando que las células progresen hacia la replicación del DNA (figura 2) (59). Las mutaciones o la ausencia de estos genes podrían tener importantes implicaciones no solo por las características biológicas del tumor, sino también por su respuesta a los agentes lesivos del DNA tales como la quimioterapia o la radiación.

La proteína p53 fue descrita por primera vez dentro de células transformadas por el virus del simio SV40, cuando se observó que formaba un complejo con el gran antígeno T- SV40. Así, estos estudios iniciales clasificaron a p53 como un antígeno tumoral (60). Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que la transfección de p53 en ciertas líneas celulares y bajo ciertas condiciones podía provocar la transformación de las mismas, lo cual condujo al paradójico error de considerar a p53 como un potencial oncogen. Evidentemente, estas transformaciones se debían a la transfección de variantes mutantes funcionalmente defectivas que inhibían de forma dominante la actividad normal de la proteína natural (61). La confirmación de p53 como gen supresor de tumores se alcanzó en 1989 cuando se demostró que su forma natural era capaz de impedir la transformación y el crecimiento derivado

de la actividad de ciertos oncogenes (62). Así, el modelo murino knock-out era capaz de desarrollarse de forma normal pero tenía una tendencia inusitada para la proliferación neoplásica. Esta circunstancia reproducía a la evolución clínica de familias afectadas por mutaciones inactivantes de p53 en línea germinal, en lo que se ha denominado síndrome de Li-Fraumeni. Estos pacientes tienen una importante tendencia para el desarrollo precoz de fibrosarcomas y cáncer de mama (63).

Aproximadamente la mitad de todas las neoplasias humanas tienen mutaciones en p53. Aunque se han descrito en todos los tipos tumorales, la frecuencia varía. Así el cáncer de colon presenta la mayor frecuencia mientras que los distintos tipos de tumores derivados del sistema genitourinario presentan frecuencias diversas. En este sentido es excepcional encontrar estas alteraciones en tumores de testículo, Wilms o feocromocitomas mientras que es habitual en los tumores de vejiga así como en próstata (64).

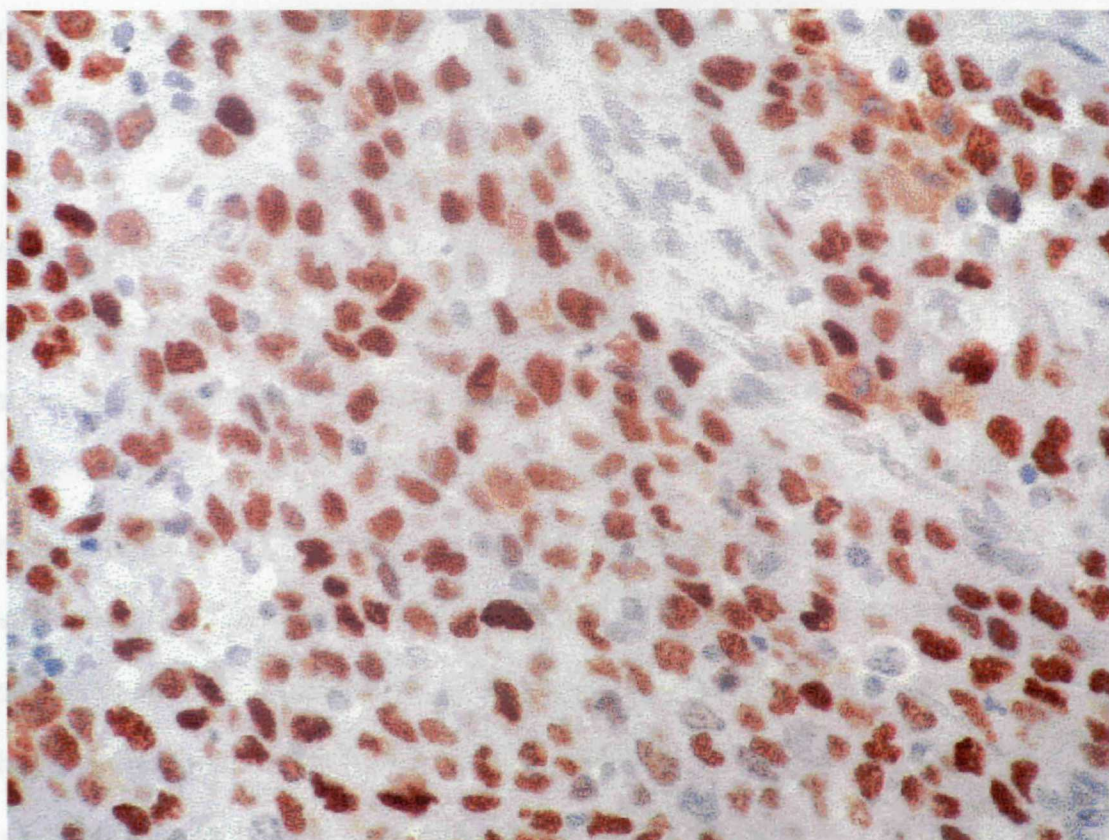
Normalmente, la concentración de p53 es baja, lo cual es debido a una semivida de 20 minutos. Además, p53 también está presente en una forma latente que precisa un proceso de activación para adquirir capacidad funcional plena. Los eventos precisos para esta activación son el daño en el DNA, la hipoxia y niveles bajos de ribonucleósidos trifosfato. El daño sobre el DNA induce un aumento en los niveles de p53, en su semivida, su activación y su capacidad de actuar como factor de transcripción nuclear. El mecanismo exacto mediante el que p53 detecta los daños del DNA así como las vías de transducción de señales posteriormente activadas no están totalmente definidas. Sin embargo parece que las roturas inter e intracatenarias del DNA, así como los metabolitos intermedios que se producen durante los eventos de

reparación genómica, podrían ser los encargados de activar a p53 (65). La hipoxia activa a p53 y podría ser la cualidad responsable del direccionamiento de las células hipóxicas hacia apoptosis (58). Finalmente, niveles bajos de ribonucleósidos trifosfato incrementan los niveles de p53. Al parecer, los niveles normales de los primeros son necesarios para una adecuada progresión del ciclo celular a partir de fase S, mientras que los niveles bajos inducen parada celular mediante mecanismos desconocidos en G0/G1 (66).

En los últimos años hemos observado una progresión geométrica en el incremento de los diversos estudios que intentaban correlacionar la presencia de mutaciones en p53 con la evolución clínica de un carcinoma de vejiga determinado, sin embargo estos estudios en los que se evaluaba de forma aislada esta proteína han obtenido resultados dispares. No obstante, el análisis aislado de esta proteína nos ha aportado un importante conocimiento sobre la biología molecular del carcinoma de vejiga. En este sentido nos hemos visto obligados a incorporar nuevas visiones sobre la multifocalidad de las neoplasias vesicales e incluso sobre el efecto de cancerización de campo de tiempos pretéritos. Así, tumores diagnosticados en diversos momentos presentaban mutaciones en p53 totalmente idénticas, lo cual apoya claramente el concepto monoclonal del carcinoma de vejiga, al menos en las circunstancias estudiadas.

De forma global podríamos considerar que la inmunotinción de p53 como resultado de mutaciones y acúmulo intranuclear son menos frecuentes en la enfermedad superficial que en la músculo-invasiva. Sin embargo, cuando están presentes se asocian a un incremento en el grado, recurrencia, progresión y descenso en la supervivencia global. A pesar de estas

**Fig 5.- Inmunotinción de p53.-** Preparación observada con objetivo x40 con clara positividad nuclear



correlaciones clínicas, la posibilidad de su uso de forma habitual es controvertida ya que en función de las series varían mucho los índices de tinción (figura 5). A pesar de estas limitaciones, su análisis aporta validez interna a otros parámetros moleculares que pretendan evaluar su potencial de predicción de comportamiento clínico.

Un análisis profundo de las principales funciones de p53 podrían apoyar la implicación pronóstica que tiene su determinación clínica. Así, la actividad de p53 natural afecta tanto a la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA como a la apoptosis. De forma global podríamos sugerir que una vez existe daño en el DNA p53 induce parada del ciclo celular y reparación de la lesión genómica, mientras que si el daño es excesivo, p53 dirige a la célula hacia apoptosis (figura 2).

En este sentido, la activación de p53 implica la interacción con una miríada de señales celulares (figura 2), que implican a p16, ciclina D1, cdk4, pRb y p21/waf-1/cip-1. La vía p16/ciclina D1/cdk4/pRb es la encargada de la regulación del paso del ciclo celular desde G1 a S (58). Existen alteraciones en el funcionamiento de alguno de los cuatro componentes en la mayoría de todos los tumores humanos. Por ejemplo, p16 es un regulador negativo de la vía y se inactiva mediante mutaciones o hipermetilación. A su vez, las alteraciones en p16 provocan la insensibilidad de la vía a la regulación negativa que esta proteína debería ejercer de forma natural. Por otro lado, la proteína Rb es crítica para la regulación del ciclo celular (figura 1) y es aberrante en muchas neoplasias. Así pRb es la diana principal de fosforilación por el complejo ciclina D1/cdk4, lo cual permite la separación del factor de transcripción E2F que está formando en su estado natural un complejo con pRb. E2F libre induce



directamente el paso de G1 a S. p21 es un gen de respuesta a p53. p21 es una proteína producida por el gen waf1-cip1 que se une a diversos complejos cdk/ciclina. La unión de p21 induce un bloqueo en la fosforilación de pRb por cdk, bloqueando la progresión del ciclo. p21 también se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), lo cual impide la actividad de PCNA sobre la replicación del DNA manteniendo su función sobre la reparación de éste (67).

La existencia de múltiples factores capaces de modular la actividad de p53 implica la posibilidad de detectar alteraciones en la expresión de muchas proteínas que podrían superar el efecto pro-apoptótico que ejercería de forma natural. Es de destacar que la actividad de p53 es modulada positivamente por la mayoría de los productos de oncogenes, lo cual protege a la célula de la proliferación incontrolada. Estos datos también son claves a la hora de comprender los motivos moleculares por los que de forma natural existe una presión selectiva negativa sobre los clones con p53 natural. Por ejemplo, en células de leucemia mieloide, la inducción a apoptosis depende de la activación de p53, siempre que ésta no suceda en presencia de IL-6, lo cual supone un efecto inhibitorio de esta última sobre la actividad del primero (68). De forma similar, el tratamiento con eritropoyetina sobre líneas celulares eritroleucémicas impiden la apoptosis por p53 (69) por lo que surge la posibilidad de que aquellas células tumorales con p53 natural que expresen el receptor de eritropoyetina escapen a la apoptosis.

El gen del Rb está localizado en el cromosoma 13p y codifica una fosfoproteína nuclear (pRb) con un peso molecular de 110 kDa. En su forma fisiológica activa, la proteína está desfosforilada y unida a un número de proteínas celulares (figura 1). Esta forma desfosforilada es la predominante en



la fase G1, ejerciendo un efecto supresor sobre la progresión celular consecuencia de su unión al factor de transcripción nuclear E2F. Después pRb comienza a fosforilarse hasta entrar en la fase G2 y permanece así en las fases G2 y M. Una vez fosforilado pRb se desacopla de E2F permitiendo que éste se desplace hacia los elementos de unión que le son propios en diversos genes, modulando finalmente su expresión. Además también actúa sobre la proliferación celular al restringir la progresión del ciclo celular en el punto de control de la fase G1 hacia S. Varios estudios han demostrado una correlación estadísticamente significativa entre pérdida de Rb, estadio y grado del tumor. Si bien esta asociación se produce en todos los estadios del cáncer de vejiga, se asocia más habitualmente a tumores invasivos (70- 73). En un estudio que investigó la correlación entre la evolución de la enfermedad y la expresión de Rb, mediante inmunohistoquímica, se observó que de 48 pacientes con tumor de vejiga, solamente 1 de 10 pacientes con enfermedad superficial tenía alterada la expresión de Rb, frente a 13 de 38 con tumores invasivos. La supervivencia global, independientemente del estadio, fue mayor en pacientes con tumores con pRb positivo, que en los negativos (74).

La parada del ciclo celular mediado por p53 se lleva a cabo mediante la inducción de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (figura 1), un inhibidor de kinasas dependiente de ciclina que puede expresarse a través de varias vías independientes de p53 (figura 2) (75- 76). Stein et al intentaron determinar la relación entre la expresión de p21 en cáncer de vejiga y la progresión de la enfermedad en 242 pacientes que se sometieron a cistectomía, con una mediana de seguimiento de 8,5 años. El estatus de p21 nuclear se determinó por IHC y posteriormente se analizó en relación con la probabilidad de recurrencia del tumor, la

supervivencia global y el estatus de p53 (77). La expresión de p21 estuvo inversamente relacionada con el estadio patológico del tumor y de los ganglios linfáticos ( $p=0,001$ ). En pacientes con enfermedad no confinada a la vejiga, sin afectación de ganglios linfáticos, la positividad de p21 (presente en 38 de los 61 casos) estuvo asociada a una tasa de recurrencia del 48% a los 5 años y a una supervivencia global del 48%. Por el contrario, los tumores p21 negativos (23 de los 61 casos) mostraron una tasa de recurrencia del 79% y una supervivencia global de tan solo el 26%. Aunque no existen publicaciones específicas, los resultados globales apuntan de forma convincente a que el estatus de p21 estratifica el grupo con fenotipo anormal de p53. De hecho, la supervivencia entre pacientes con fenotipo alterado de p53, pero manteniendo la expresión de p21, fue similar a la de los pacientes con estatus normal de p53. Por el contrario, los pacientes con fenotipo de p53 alterado y pérdida de p21 tuvieron un pronóstico peor. Sin embargo la influencia de la quimioterapia en estos resultados es desconocida y no puede despreciarse como irrelevante hasta que no sea investigado de forma apropiada. Curiosamente, los pacientes con niveles más altos de expresión de p21 tuvieron peor pronóstico, lo que podría explicarse por su correlación directa con estadios más altos, y probablemente refleja la disregulación en otras vías, en tumores en los que la alteración de p53 no es la principal causa de progresión. Por tanto, en carcinomas de vejiga en los que la alteración en la vía del retinoblastoma juega un papel preponderante en la progresión de la enfermedad, una ruta intacta p53/p21 capacita a la célula tumoral para regular la expresión de p21 con el fin de detener el ciclo celular en el punto de restricción de la fase G1 a S (figura 1).

La progresión de una célula a través del ciclo celular está promovida por las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que son reguladas tanto positiva como negativamente por ciclinas e inhibidores de kinasas dependientes de ciclina respectivamente (figura 1). La ciclina D1 es un importante regulador positivo del punto de restricción G1, que promueve la inactivación de la proteína del gen de Rb. Esta está mediada por la interacción con CDK4/6 y la posterior fosforilación de la proteína del Rb. La ciclina E, una vez asociada con CDK2, induce el paso a la fase S. En muchos tumores sólidos, entre ellos el carcinoma de células transicionales de vejiga, se han encontrado mutaciones, inactivación y sobreexpresión de estos genes. Además, en muchos estudios, aunque no en todos, se ha comprobado su correlación con estadios avanzados y mal pronóstico.

Se ha demostrado que el producto del gen de la ciclina D1 correlaciona con el bajo grado, el bajo estadio y el crecimiento papilar en carcinomas de vejiga primarios (78- 79) y se ha sugerido que juega un papel importante en la progresión del cáncer de vejiga (80). En un estudio que investigó los niveles de expresión de ciclina D1 en carcinoma de células transicionales de vejiga y correlacionaba estos resultados con los datos relativos a expresión de p53, pRb y ki67, la expresión de ciclina D1 fue un indicador pronóstico independiente de supervivencia en los pacientes con enfermedad músculo invasiva (81).

La proteína p27<sup>kip1</sup> es un inhibidor de los complejos de quinasas dependientes de ciclinas que bloquea la transición de la fase G1 a S (figura 1). Kamai et al estudiaron la relación entre los niveles de proteína p27, ciclina E y ki-67 y los aspectos clínicopatológicos de 145 pacientes japoneses con

carcinoma de células transicionales de vejiga, a través de IHC. Los bajos niveles de p27 se asociaron con baja expresión de ciclina E, alto ki-67, alto grado, invasión muscular y metástasis de nódulos linfáticos. La baja expresión de ciclina E y el alto ki-67 correlacionó con alto grado, invasión muscular y metástasis de nódulos linfáticos. Los niveles de ciclina E correlacionaron inversamente con ki-67. La presencia escasa de ciclina E y un índice alto de proliferación evaluado por Ki67 se correlacionaron con un acortamiento del período libre de enfermedad y con la supervivencia global. En los tumores superficiales de vejiga (Ta, T1; 86 pacientes) se observó una correlación significativa entre bajo nivel de tinción de p27 y alto índice ki-67 y recurrencia precoz ( $p=0,0048$ ,  $p=0,0178$  respectivamente). Entre los tumores superficiales recurrentes (35 pacientes), aquellos que no progresaron en estadio mostraron niveles altos de p27 y de ciclina E, mientras que los que progresaron a invasivos, mostraron un descenso gradual a lo largo del tiempo en los niveles de p27 y ciclina E. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos que apuntaban que la pérdida de expresión celular de ciclina E correlacionaba con una mayor agresividad histológica y una menor supervivencia de los pacientes (82). Estos resultados sugieren que un descenso en la expresión de p27 y de ciclina E jugarían un papel en la progresión del cáncer de vejiga. Por ello, la evaluación de sus niveles puede ser muy útil en el manejo de la enfermedad (83).

Muchas de las proteínas anteriormente descrita están influenciadas por estímulos externos que inducen crecimiento (factores de crecimiento) o por alteraciones intrínsecas a ciertas rutas de señalización que se desregulan hacia proliferación (productos de oncogenes). La activación de protooncogenes

requiere mecanismos tales como la amplificación del gen o la mutación puntual de un alelo único, lo que conduce a la sobreexpresión. Esta activación se puede producir por: factores de crecimiento anormalmente activados, receptores del factor de crecimiento (por ej c-erbB-2), proteínas de señalización intracelular (por ej Ras) y factores de transcripción nuclear (por ej c-Myc).

Un ejemplo relevante en carcinoma de vejiga son los miembros de la familia Ras. Estos oncogenes codifican una proteína de 21-kDa con actividad GTPasa, que es esencial como señal de transducción intracelular. Las mutaciones sin sentido dan lugar a sustituciones de aminoácidos, que producen la activación. En el cáncer de vejiga se han identificado mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61 en H-ras (84) Sin embargo la presencia de H-ras no correlacionó ni con el grado ni con el estadio del tumor en diferentes estudios. Por otra parte, las mutaciones de los oncogenes ras no son consideradas como eventos importantes en el cáncer de vejiga.

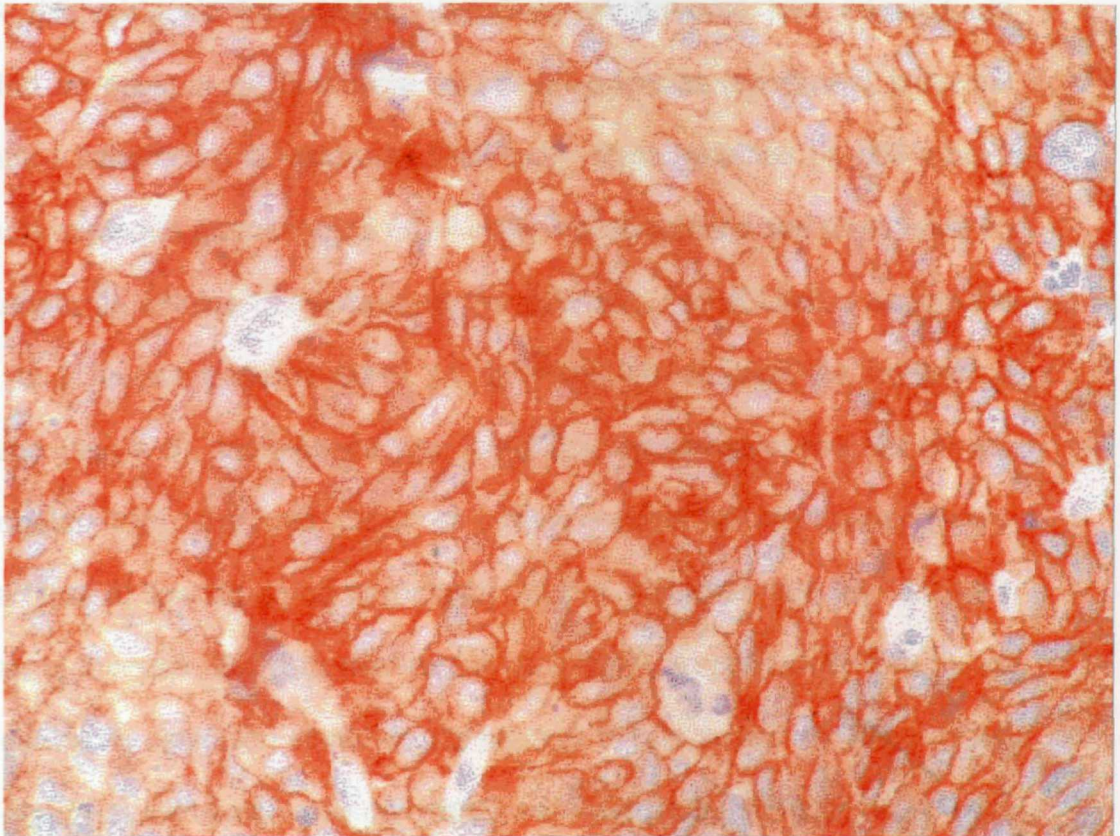
Por otro lado, un aumento de copia del oncogén myc se ha implicado mediante hibridación genómica comparativa y la hibridación in situ en los tumores de alto grado y alto estadio (85- 86). Sin embargo no se ha encontrado correlación con la progresión ni con la supervivencia (87- 88).

En los últimos años ha tomado mucha relevancia la presencia de miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico en la evolución y tratamiento del carcinoma de vejiga. Estructuralmente son proteínas transmembrana con dominio citoplásmico que transmiten señales al interior de la célula en respuesta a su unión con un ligando extracelular. Funcionan como proteínas que fosforilan residuos de tirosina. Varios investigadores han publicado una correlación positiva entre la sobreexpresión

de EGFR y el alto grado-estadio del cáncer de vejiga. Sin embargo, existe controversia sobre su implicación como un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer de vejiga avanzado (89- 92). La expresión de EGFR en tumores metastásicos y en sus correspondientes primarios correlaciona bien a pesar de la exposición a quimioterapia y/o radioterapia. El tratamiento dirigido frente a EGF-R es potencialmente aplicable a la enfermedad metastásica (93).

Aunque no se ha identificado un ligando bien definido para Her-2/neu, se ha detectado una correlación entre amplificación y sobreexpresión de Her-2/neu y mal pronóstico. En el 32% de las muestras de cáncer invasivo, se encontró una amplificación aumentada del gen c-erbB-2 (figura 6), que correlaciona con estadios histopatológicos avanzados (94). Sin embargo el nivel de expresión y la significación pronóstica de esta proteína en el cáncer urotelial varió ampliamente en los diferentes estudios. La explicación a estas discrepancias está en las diferentes metodologías utilizadas y en la definición de la positividad del test. Uno de los hallazgos más consistentes e interesantes es la frecuente sobreexpresión de Her-2/neu sin amplificación genética, lo que soporta la utilidad de IHC en la detección de esta proteína. Jimenez et al (95) estudiaron la validez pronóstica de la sobreexpresión de Her-2/neu en carcinomas uroteliales invasivos de vejiga. Her-2/neu se sobreexpresó en el 28% de los carcinomas uroteliales primarios y no tuvo significación pronóstica en cuanto a supervivencia. La incidencia de sobreexpresión fue significativamente más alta en localizaciones metastásicas que en primarias. Los tumores primarios positivos a Her-2/neu desarrollaron

**Fig 6.- Inmunotinción de c-erb-B2.-** Preparación observada con objetivo x40, en la que se aprecia intensa positividad tanto de membrana como de citoplasma.





metástasis Her-2/neu positivas, sin embargo los tumores Her-2/neu negativos estuvieron asociados a metástasis de nódulos linfáticos Her-2/neu positivos en el 45% de los casos y a metástasis a distancia positivas en el 67% de los casos. Ya sea esta diferencia debida a la adquisición de fenotipo positivo a Her-2/neu cuando el tumor desarrolla potencialmente metástasis, o ya sea por un muestreo al azar, la determinación del estatus de Her-2/neu parece ser más exacta cuando se realiza en tumores metastásicos, especialmente cuando el tumor primario es negativo.

### Apoptosis

A diferencia de las células normales, los tumores han adquirido la capacidad de escapar de la muerte celular programada (apoptosis) inducible por eventos tales como la lesión del DNA entre otros. Además de p53 y bcl-2 otras moléculas que marcan rutas en el complejo apoptótico son anormales en el carcinoma de células transicionales. Por ejemplo, Fas (CD95) y su ligando (FasL), que juegan papeles clave en la iniciación de una vía apoptótica (figura 3), también se han implicado en el carcinoma de células transicionales (96). En este caso, el carcinoma de células transicionales expresa tanto al ligando como al receptor de Fas, mientras que las células T expresan el receptor. De esta manera, el carcinoma de células transicionales podría causar la delección clonal de las células T que fueran dirigidas contra los antígenos de los carcinomas de células transicionales y así proporcionar un mecanismo de escape para la supervivencia inmunológica. La coexpresión de ambos: Fas y su receptor en los carcinomas de células transicionales sugiere que las células tumorales se han adaptado a escapar de la activación autocrina



de esta vía. Esta hipótesis cobra fuerza a la luz de los resultados obtenidos por Bugajska et al. (97).

Recientemente se ha detectado un inhibidor de apoptosis, la survivina (98). No se ha encontrado asociación de la misma con el pronóstico, sin embargo su detección en orina de pacientes con carcinoma de células transicionales tuvo un 100% de sensibilidad y un 95% de especificidad en el diagnóstico de la recurrencia (99). Este test sería una herramienta válida para el seguimiento de pacientes con carcinoma de células transicionales.

La proteína bcl-2 juega un papel primordial en la supresión de la apoptosis (figura 2), y de esta forma en la inhibición de respuestas a la quimioterapia y radioterapia. En epitelio transicional normal y en carcinoma superficial de células transicionales, se observó inmunoreactividad de bcl2 en la capa basal y no en el frente invasivo. La inmunoreactividad de bcl-2 correlacionó inversamente con el grado histológico y con la inmunoreactividad de p53 y no correlacionó ni con la categoría pT, ni con la supervivencia global, ni con la progresión de la enfermedad ni con la expresión de PCNA. Por ello se ha sugerido que la expresión de bcl-2 en tumores de vejiga se asocia con un fenotipo menos agresivo. Además, bcl-2 se ha evaluado prospectivamente como factor pronóstico de carcinoma de células transicionales de vejiga en pacientes menores de 40 años y se comparó con pacientes mayores de 50 años. Se encontró sobreexpresión citoplásmica de bcl-2 en la mayoría de los pacientes más jóvenes, pero no se asoció ni con progresión del tumor ni con recurrencia (100). Por el contrario, en un estudio de 109 pacientes con cáncer invasivo tratados con RT preoperatoria sin quimioterapia concurrente, Pollack et al demostraron que la sobreexpresión de bcl-2 estaba significativamente

asociada a la progresión y al alto estadio del tumor durante la RT, pero no tenían impacto significativo en la respuesta a la combinación de quimioterapia basada en platino con la radioterapia (101), lo cual podría explicarse por la aplicación simultánea de quimioterapia basada en platino. Como la apoptosis inducida por cisplatino se ha demostrado independiente de los niveles endógenos de proteínas de la familia de bcl-2 en algunos tumores, podría argumentarse que la quimioterapia podría compensar la menor eficacia de la radiación en tumores que sobreexpresan bcl-2. Esto coincide con la observación clínica de que la radioquimioterapia es más efectiva en términos de reducción del estadio y de alcanzar una remisión completa del cáncer de vejiga que la radioterapia sola (102- 104). En consecuencia, los tratamientos dirigidos frente a bcl-2 podrían tener un papel en el aumento de respuesta a la radioterapia en pacientes con tumores de vejiga.

## EL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA

El receptor de eritropoyetina (EPOR) está codificado por un gen localizado en el cromosoma 19p13.3-19p13.2. Su estructura génica está constituida por ocho exones que traducen una proteína de 508 aminoácidos con aproximadamente 55 kDa de peso molecular (ENSEMBL ENSP00000222139). Su estructura está configurada por tres regiones fundamentales: el dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular.

La región extracelular está subdividida a su vez en dos áreas separadas por una pequeña región bisagra. Están constituidas por 7 hojas plegadas beta apiladas en una estructura similar a un dominio tipo inmunoglobulina. El área más lejana a la membrana está orientada de tal manera sobre el área más cercana que forma un ángulo de 90° con ésta. Una pequeña hélice alfa localizada en la región N-terminal del dominio más lejano a la membrana podría ayudar en la estabilización de la estructura terciaria de toda la región extracelular del receptor. El dominio más lejano de la región extracelular contiene los cuatro residuos cisteína comunes a otros receptores de citoquinas. Estas cisteínas generan dos puentes disulfuro que estabilizan la región distal. La otra región común se localiza en el dominio más cercano a la membrana y, tal y como se predijo por mutagénesis dirigida, es otro responsable de la estabilización de la estructura terciaria del receptor (105). Estas regiones conservadas asignan a EPOR a la familia de receptores de citoquinas (en el dominio extracelular cuatro residuos cisteína, un grupo de residuos aromáticos y una estructura lineal configurada por la secuencia triptofano-serina-X-

triptofano-serina). Otra estructura compartida con la citada familia de receptores es la presencia de una única región transmembrana.

El dominio intracelular se divide en dos regiones funcionales. La región más próxima a la membrana contiene dos dominios denominados box-1 y box-2 que son muy similares a otros dominios presentes en otros receptores de citoquinas. Esta región es crítica para la mitogénesis y la diferenciación asociada a la eritropoyetina una vez unida a este receptor. Por el contrario, la región mas alejada de la membrana parece jugar un papel importante en la regulación negativa de la señalización asociada a la activación del receptor. En esta región existen ocho residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados y que están implicados en el anclaje de varias moléculas de señalización intracelular (105)..

#### LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADA A EPOR.

La eritropoyetina (EPO) es el ligando natural de este receptor. Habitualmente, una molécula de EPO se une a dos moléculas de EPOR formando un homodímero (figura 7). A partir de ese momento se inician los cambios necesarios para iniciar la señalización asociada a la activación de EPOR y la posterior internalización y degradación del complejo EPO-EPOR dentro del citoplasma.

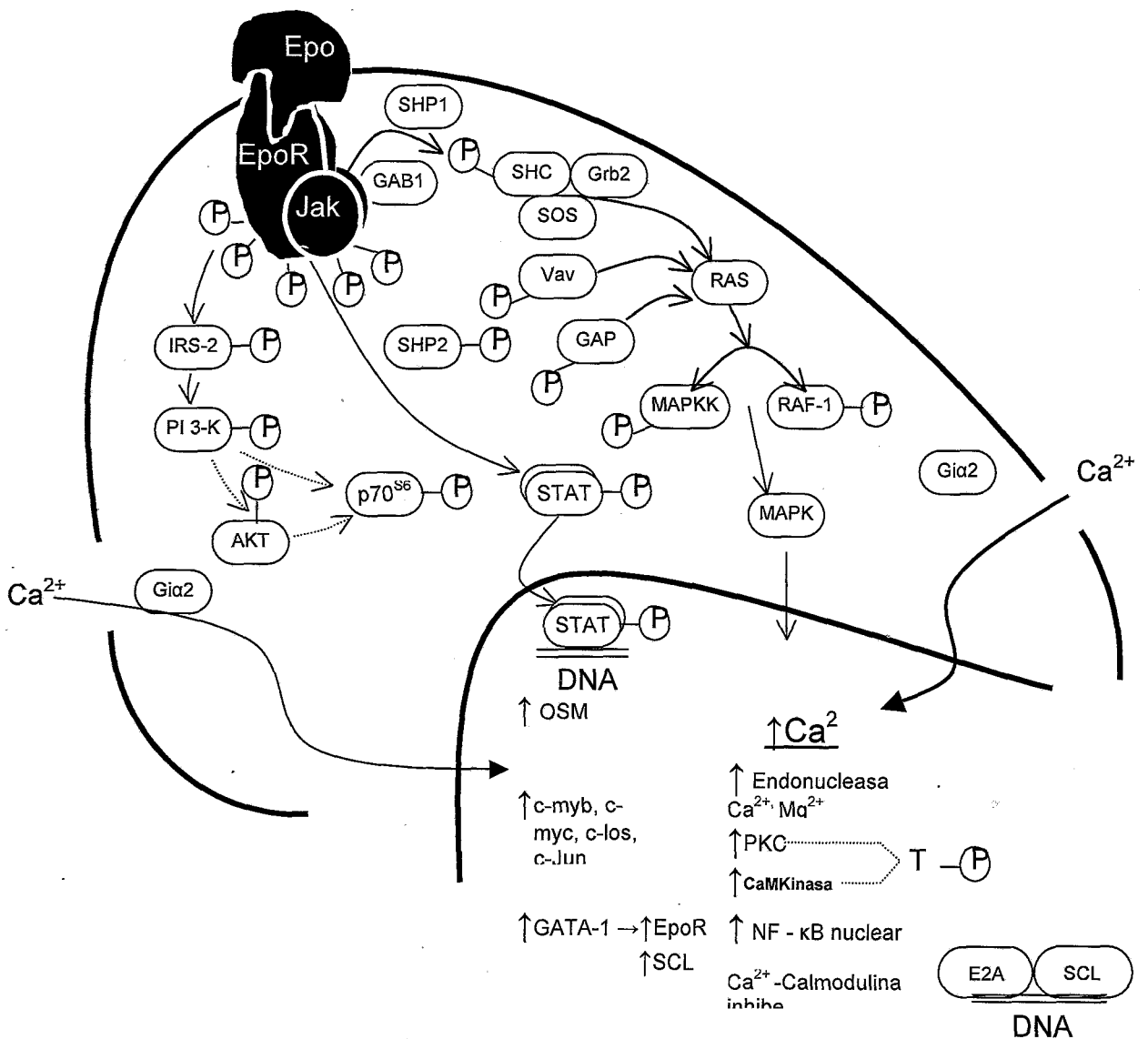
EPOR carece de actividad enzimática intrínseca por lo que precisa la asociación con otras proteínas que presenten esta función. Así, JAK2 es la quinasa responsable de la primera fosforilación de EPOR (106), aunque se han implicado también a otras quinasas. JAK2 está asociada al receptor antes de su unión con el ligando y se activa rápidamente tras su asociación. Si JAK2 presenta una menor actividad que la conferida de forma natural, la células en

las que está presenta son incapaces de proliferar, diferenciarse en respuesta a EPO (107). Por otro lado, la activación de JAK2 precisa de una orientación determinada del ligando, por lo que cambios en la estructura terciaria del receptor implicarán modificaciones en la eficiencia de autofosforilación que presentará JAK2 (108).

Las dos principales vías activadas tras la unión de EPOR con EPO son JAK/STAT y Ras/MAPK. Así, una vez activado el receptor y fosforilado por JAK2, la proteína STAT5 se une específicamente a los residuos fosfotirosina de éste desplazando a esta proteína a las proximidades de JAK2, fosforilándose a su vez por ella. Tras su fosforilación por JAK2, las proteínas STAT se dimerizan translocándose hacia el núcleo donde actuarán como factores de transcripción (109). Lyn es una tirosin-quinasa que está pre-asociada al receptor y también se activa tras la unión de EPOR con su ligando. La represión de lyn impide en diversos sistemas celulares su diferenciación pero no induce muerte celular, a diferencia de JAK2, cuya inhibición induce apoptosis. Además, se ha demostrado que lyn se asocia a JAK2 y puede modificar la fosforilación de ésta sobre STAT5 (110).

La vía de señalización Ras/MAPK es mucho más compleja (figura 8). La proteína Grb2 se une directamente o a través de una proteína adaptadora denominada Shc, a los residuos fosfotirosina de EPOR. Grb2 puede así actuar tanto como elemento de anclaje sobre SHP-2, cbl o SOS, lo cual induce la activación de la actividad GTPasa de Ras. A la vez, la proteína GAP se fosforila inhibiendo la desactivación de Ras. La activación de Ras desplaza a la siguiente molécula, Raf, desde el citoplasma hacia la faceta intracitoplasmática de la membrana celular, lugar donde es fosforilada y transformada en su forma

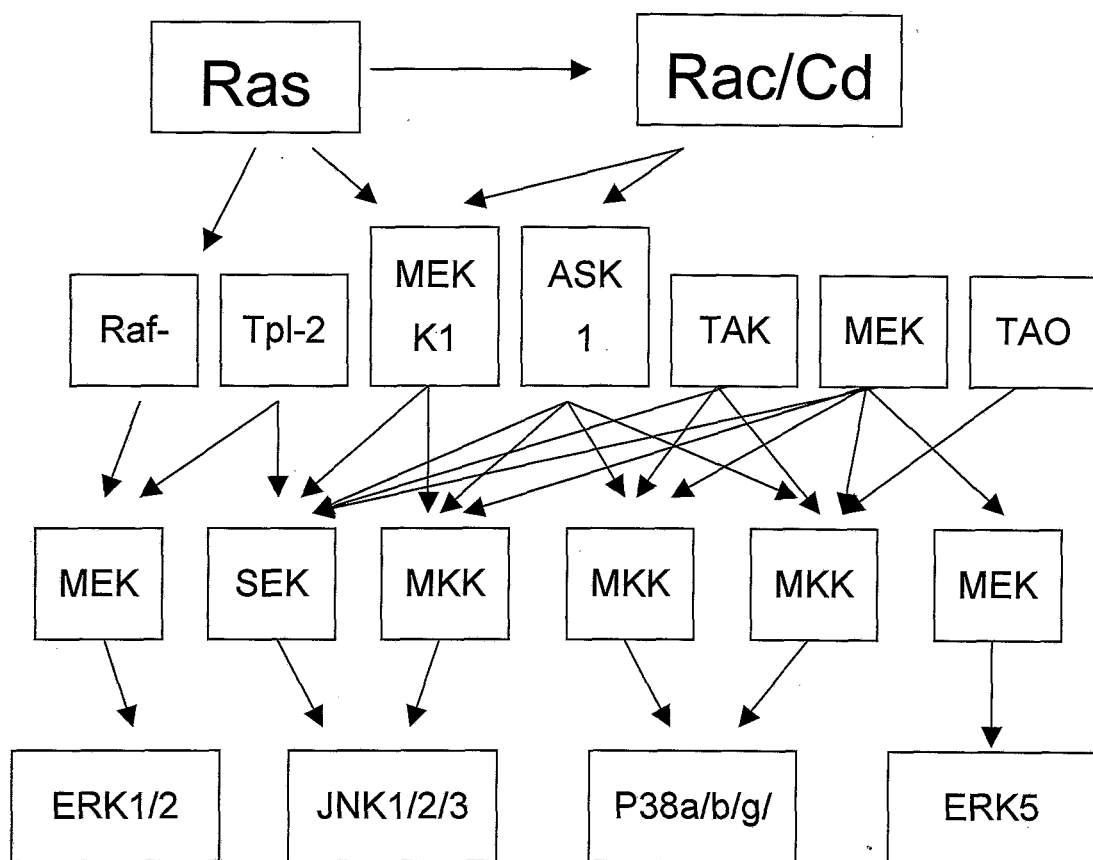
**Fig. 7.- Señalización por EPOR.** La unión de EPO con su receptor activa las vías de JAK/STAT, RAS/MAPK y PI3K/AKT. Las proteínas STAT se traslocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. La inhibición de JAK2 induce apoptosis. La activación de RAS induce posteriormente la de MAPK. Además de estas vías principales EPOR induce fosfolipasa C gamma, SHIP, JNK, Vav, fes/fps y PI3K



funcional. De esta manera, Raf fosforilada activa MEK que continua la cascada de señalización activando las siguientes quinasas de la vía MAPK (111).

Otras vías de señalización inducidas por la activación de EPOR son la fosfolipasa Cgamma, SHIP, JNK, vav, fes/fps y PI3K (112). Debemos destacar que los estudios realizados sobre ratones EPOR  $-/-$  han demostrado que la tirosina situada en posición 479 es absolutamente esencial para los efectos de diferenciación y proliferación asociados a EPOR. En este sitio de unión es donde se ha implicado la activación de PI3K y MAPKs (113).

**Figura 8. Señalización por Ras/MAPK**





## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE EPOR

La regulación de la expresión de EPOR es muy compleja. En la línea celular eritroide J2E, la transcripción del gen de EPOR, los niveles de mRNA, de proteína o los ratios de traducción no se modifican con la manipulación hormonal. Sin embargo, existe una regulación negativa que afecta a casi el 95% de los receptores de superficie a las 48 horas de la estimulación con EPO (114). Esto sugiere un procesamiento post- traduccional o una traslocación como parte importante del mecanismo de control de EPOR en la superficie de la célula.

Uno de los principales mecanismos de regulación de la función de EPOR es la desfosforilación del receptor y de JAK2. Esta función parece recaer sobre la fosfatasa SHP-1, que se une al dominio de regulación negativa de EPOR. Una vez unida, SHP-1 desfosforila los residuos tirosina tanto de JAK2 como de EPOR, inactivándolos (115). Otro regulador negativo es CIS. EPO induce la expresión de CIS a través de la vía JAK/STAT y se une a EPOR en la tirosina localizada en posición 401. Como este residuo tirosina es uno de los principales sitios de unión de STAT5, CIS actúa como regulador negativo de STAT5 (116)

## FUNCIÓN BIOLÓGICA DE EPOR Y SUS IMPLICACIONES EN CÁNCER.

La función fisiológica de EPOR se ha demostrado sobre modelos murinos en los que no se expresaba. En estos ratones, la eritropoyesis progresa hasta el estadio de BFU-E pero termina en la colonia formadora de unidades eritroides, por lo que los eritrocitos no se forman. Este hecho

evidenció la necesidad de EPOR para los estadios tardíos del desarrollo de hematíes (112). Sin embargo la expresión de EPOR se ha detectado en otros sistemas biológicos diferentes a los implicados en hematopoyesis tales como en ciertos estadios de megacariocitos, endometrio, célula endoteliales, mieloblastos, sistema nervioso central y, de modo más inquietante, en ciertas neoplasias (117). Así, se ha descrito expresión de EPOR en tumores de células renales, carcinoma de mama, melanoma, hepatoma HEP3B, células HeLa, neuroblastoma SHSY5Y, glioblastoma U87 y en líneas de gliomas malignos tales como las U251 y U373. Esta observación junto al papel estimulante de la proliferación que se le atribuye a su activación por ligando ha generado en los últimos años una importante incertidumbre sobre las implicaciones que tanto la expresión de estos receptores como la administración de EPO exógena juegan sobre la evolución de las neoplasias malignas humanas.

En relación con el carcinoma de vejiga, sólo existen dos estudios (118)(119) que han analizado la expresión de EPOR. Estos estudios emplearon microarrays de cDNA para evaluar la expresión del mRNA de EPOR en las neoplasias vesicales frente al tejido normal sin que encontraran diferencias significativas entre ambos tejidos. Sin embargo, tal y como se ha descrito previamente, la regulación en la expresión del receptor parece realizarse a través de cambios post-traduccionales por lo que la evaluación de la expresión proteica podría ser de gran valor. Además, la correlación con la evolución clínica de los pacientes sobre los que se realiza la determinación es clave a la hora de comprender las implicaciones que podría tener la expresión anormal de esta proteína.

Por otro lado se ha sugerido una relación entre la expresión del receptor de eritropoyetina y la inducción de angiogénesis (120- 122). En este sentido debemos destacar que el aumento de la densidad microvascular (DMV) se correlaciona con una mayor incidencia de metástasis y un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, entre ellos el de vejiga (123- 124). Inoue et al. evidenciaron que la DMV, cuando aparecía en muestras de biopsias o en enfermedad residual tras quimioterapia, era un predictor significativo de la progresión de la enfermedad (como se refleja en el acortamiento de la supervivencia sin enfermedad) en pacientes con tumores invasivos tratados con M-VAC neoadyuvante y cistectomía (125). Este hecho encaja con observaciones previas de correlación positiva entre DMV y la presencia de metástasis de nódulos linfáticos (126). Aunque se han descrito numerosos factores angiogénicos, la importancia relativa de factores angiogénicos individuales en la mayoría de los cánceres es todavía bastante incierta. Varias publicaciones describieron expresión aumentada del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en tejido, en suero y en orina de pacientes con cáncer de vejiga y su asociación con la recurrencia de la enfermedad (127- 129). Mizutani et al. demostraron que el nivel de plaquetas derivado de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en el carcinoma de vejiga era paralelo al incremento del estadio y grado histológico (130). IL-8, una citoquina con actividad proangiogénica, promueve la invasión y la metástasis del carcinoma de vejiga humano (131). Crew et al demostraron que la alta expresión del mRNA de VEGF en 55 cánceres superficiales de vejiga estaba asociada con recurrencia precoz ( $p=0,001$ ; RR: 3,09) y progresión a fenotipos

más invasivos ( $p=0,02$ , RR: 5,33) (132). En un estudio preliminar para evaluar el significado pronóstico de los factores proangiogénicos en pacientes con tumores invasivos tratados con quimioterapia neoadyuvante y cistectomía radical, solo la expresión de bFGF correlacionó con la recurrencia de la enfermedad. Sin embargo y a pesar de las potenciales implicaciones que tiene la presencia del receptor de eritropoyetina en las células tumorales, no existe ningún trabajo que haya analizado la presencia de esta proteína en tumores vesicales.

Por todo ello, el objetivo fundamental de este trabajo es el análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de EPOR en diferentes estadios del carcinoma de células transicionales de vejiga y su relación con la evolución clínica de estos pacientes así como con otras variables moleculares que se han sugerido como fundamentales en la evolución clínica de esta neoplasia.

## 2 - HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El carcinoma de vejiga es un reto terapéutico que implica una aproximación multidisciplinar que permita la mejor selección posible de aquellos pacientes con mayor riesgo de muerte por la enfermedad. Los distintos factores pronósticos descritos a lo largo de la sección anterior nos han permitido agrupar de forma razonablemente fiable a los distintos pacientes y decidir la actitud terapéutica más adecuada en función del riesgo de recidiva y por tanto de muerte. Sin embargo, la gran cuestión a resolver en la gestión inicial de los pacientes con carcinoma de vejiga gira en torno al pronóstico a medio plazo de éstos. Por un lado, existe una gran controversia sobre el tratamiento inicial de estos pacientes ya que con los parámetros actuales de predicción de riesgo de recaída mortal, esto es recaída invasiva o a distancia, no es posible determinar con seguridad quien pertenece claramente a cada grupo de riesgo. En este sentido, la falta de seguridad sobre la asignación a un grupo de riesgo impide adecuar el tratamiento a la probabilidad de morir por esta enfermedad. Además, el tratamiento ajustado al riesgo depende en gran medida del estadio (T) y del grado de la neoplasia (G), estando estas características histológicas limitadas por su nivel de reproducibilidad. Por ejemplo, Bol y colaboradores evaluaron la variabilidad interobservador de la afectación de la lámina propia para diferenciar tanto tumores pTa de tumores pT1 como diferentes grados en 130 pacientes consecutivos. Existió concordancia en el 80% de los casos al evaluar estadio (T) mientras que ésta fue inferior al 60% en la evaluación del grado (19). Otros autores han demostrado diferencias similares (20, 21). Por otro lado, la toxicidad de los tratamientos aplicados no debe superar el potencial beneficio que sobre un

paciente determinado debe esperarse ya que sobre- trataremos pacientes curados y aplicaremos terapias poco eficaces a pacientes con enfermedad oculta muy agresiva.

La selección racional del tratamiento más adecuado está limitada por la incapacidad de seleccionar individualmente a los pacientes en los que la terapia intravesical está destinada a ser ineficaz frente a aquellos que se beneficiarían de una cirugía radical desde el principio. Además, el seguimiento clínico está fundamentado tras la terapia inicial en guías clínicas en las que se consideran los factores pronóstico anteriormente expuestos, por lo que se asignarán innecesariamente recursos valiosos a grupos de pacientes sin riesgo real de recaída.

En los últimos años, la finalización del proyecto Genoma Humano y el desarrollo biotecnológico asociado a éste ha permitido la identificación de múltiples proteínas potencialmente implicadas en el desarrollo y progresión de las neoplasias humanas. Así pues, la aplicación sobre muestras clínicas de todos estos avances ha permitido en muchos casos la subclasificación en grupos de riesgo a pacientes en los que la taxonomía histológica no era suficiente para asegurar el pronóstico. Sin embargo, la prudencia debe guiar todas estas aproximaciones ya que con más frecuencia observamos como estas tecnologías de alto rendimiento en la evaluación genómico- proteómica de las neoplasias son de difícil reproducibilidad. No es extraño en la literatura científica la publicación de cientos de potenciales marcadores implicados en progresión, proliferación e invasividad, sin relación entre unos y otros y de difícil aplicación clínica. Por ejemplo, hoy día podemos relacionar anomalías en el cromosoma 9 con la presencia de un cáncer transicional TaG1 así como

mutaciones en p53 con un T2G3, pero la presencia y complejidad de multitud de rutas moleculares hacen inviable la utilidad de marcador molecular alguno (22).

Los marcadores moleculares podrían jugar un gran papel en selección racional de la terapia más adecuada en función del riesgo real de cada individuo. Sin embargo, el patrón de oro actual es la estadificación clínico-patológica ya que ningún otro marcador ha sido capaz de superar este método de predicción.

Sánchez-Carballo y cols han utilizado la tecnología de los microarrays de cDNA con 17842 genes para evaluar el pronóstico de un grupo de pacientes con carcinoma de vejiga. De esta forma han identificado un grupo de pacientes con neoplasias superficiales con un perfil similar a otros con enfermedad invasiva. En este grupo de pacientes existían perfiles comunes que implicaban a citoqueratina 20, neuropilina-2, p21, p33ING1 y DEK entre otros. Además era factible separar grupos de pacientes con CIS de otros con tumores papilares así como subgrupos de pacientes con tumores invasivos y otros con estadios precoces con diferentes supervivencias globales (23).

Dyrskjot et al identificaron un subgrupo de 32 genes capaces de predecir la evolución clínica de tumores Ta frente a la clasificación histológica clásica. Además, este subgrupo se evaluó en términos funcionales identificando potenciales dianas terapéuticas (24)

La introducción de la huella molecular en la práctica clínica diaria debe estar guiada por el pragmatismo y encaminada a responder la cuestiones fundamentales que rodean la gestión clínica de los pacientes con carcinoma de vejiga: ¿qué, cuando y a quien?



El receptor de eritropoyetina es una proteína transmembrana que traduce señales de crecimiento sobre la célula en la que se expresa. Hasta la fecha, sólo existe evaluación mediante microarrays de cDNA de la presencia de este receptor en neoplasias vesicales. Esta observación ha generado en los últimos años una importante incertidumbre sobre las implicaciones que tanto la expresión de estos receptores como la administración de EPO exógena juegan sobre la evolución de las neoplasias malignas humanas. Así, la evidencia de expresión de mRNA de EPOR en carcinomas transicionales de vejiga y la necesidad de evaluar clínicamente nuevos factores pronóstico que nos permitan decidir adecuadamente los tratamientos y seguimientos clínicos de estos pacientes.

### 3 - MATERIAL Y MÉTODOS

**Pacientes.**

Se seleccionaron 75 pacientes consecutivos que habían sido sometidos a cistectomía radical por carcinoma de vejiga, en estadio clínico 3 o inferior. Todos firmaron el consentimiento informado tanto sobre el procedimiento quirúrgico, como sobre el anestésico y la posibilidad posterior de gestión investigadora de aquellos especímenes tisulares que no comprometieran el diagnóstico de certeza o el estudio de extensión local o a distancia de la neoplasia.

Todos los pacientes habían sido evaluados mediante radiografías posteroanterior y lateral de tórax, ecografía abdominal, urografía intravenosa, gammagrafía ósea, hemograma completo, bioquímica hepática y citología urinaria. También se estableció su función renal a través del aclaramiento de creatinina en 24 horas. En todos los casos se descartó afectación a distancia antes de la intervención quirúrgica.

**Evaluación histopatológica.**

Todos los especímenes obtenidos en la intervención quirúrgica fueron fijados en formaldehído al 10% antes de 30 minutos desde su obtención y durante un periodo no superior a las 24 horas. Posteriormente fueron tallados e incluidos en parafina siguiendo los procedimientos habituales de cualquier Departamento de Anatomía Patológica de un Hospital Universitario. Se realizaron tinciones mediante el método de hematoxilina-eosina para el diagnóstico inicial.

Un patólogo experto en tumores vesicales realizó el diagnóstico, estratificó y clasificó patológicamente cada una de las neoplasias. Para ello, se utilizó el sistema TNM y la gradación de neoplasias vesicales sugerida por la OMS:

T: Invasividad del tumor

Ta. Carcinoma papilar no invasivo

Tis. Carcinoma in situ: tumor plano

T1. El tumor invade el tejido conjuntivo subepitelial

T2. El tumor invade el músculo

T2a. El tumor invade el músculo superficial (mitad interna)

T2b. El tumor invade el músculo profundo (mitad externa)

T3. El tumor invade el tejido perivesical

T3a. Microscópicamente

T3b. Macroscópicamente (masa extravesical)

T4. El tumor invade cualquier de las siguientes partes: próstata, útero, vagina, pared pélvica o pared abdominal.

T4a. El tumor invade próstata, útero o vagina.

T4b. El tumor invade la pared pélvica y la pared abdominal.

N. Ganglios linfáticos regionales.

N0. Ausencia de ganglios linfáticos regionales.

N1. Metástasis en un ganglio linfático, de 2 cm o menos en su dimensión mayor

N2. Metástasis en un ganglio linfático, de más de 2 cm pero de menos de 5 cm en su dimensión mayor o múltiples ganglios linfáticos de no más de 5 cm en su dimensión mayor.

N3. Metástasis en un ganglio linfático mayor de 5 cm en su dimensión mayor.

Los estadios patológicos se consideraron como sigue a continuación

Estadio 0a. T<sub>a</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>

Estadio 0is. T<sub>is</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>

Estadio 1. T<sub>1</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>

Estadio 2. T<sub>2a</sub>/T<sub>2b</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>

Estadio 3. T<sub>3a</sub>/T<sub>3b</sub>/T<sub>4a</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>

Estadio 4. T<sub>4b</sub> o cualquier N o metástasis a distancia.

La determinación del grado tumoral se realizó siguiendo el sistema de clasificación establecido por la Organización Mundial de la Salud que intenta establecer el concepto citológico de malignidad, que representa la rapidez de la multiplicación celular basada en la anaplasia:

- Grado 1, de bajo grado o bien diferenciado. Se consideraron de bajo grado aquellos tumores con estructuras papilares claramente identificables, delgadas pero con abundantes ramificaciones y escasas fusiones, que aparentaban estar ordenadas pero con claras alteraciones estructurales y citológicas. Existía variación en el tamaño nuclear y en su polaridad, con formas redondeadas y con nucleolos escasos e inconspicuos. Aunque presentaban gran actividad mitótica a todos los niveles, la máxima actividad se registraba en capas basales. Las células superficiales solían estar

presentes pero eran planas y de menor tamaño que las de epitelio considerado como normal.

- Grado 2, de grado intermedio o moderadamente diferenciado. Estos tumores fueron considerados como aquellos que no cumplían criterios para ser incluidos ni dentro de los grupos de alto o ni de los de bajo grado.
- grado 3, de alto grado o pobremente diferenciado. Las papilas eran irregulares, habitualmente fusionadas y con abundantes ramificaciones, con un estroma difícilmente identificable. Poseían un patrón arquitectónico (estructural) desordenado, con gran variación citológica a aumentos mayores. Debía existir un importante polimorfismo nuclear y gigantismo, se apreciaban nucleolos evidentes y se registraba actividad mitótica aumentada. Existía pérdida de la cohesión intercelular. No existían células superficiales.

Se ha empleado el sistema de clasificación definido por la OMS en su versión de 1973, ya que es el más empleado en la práctica clínica en nuestro entorno. Las correlaciones entre este sistema y las actualizaciones posteriores están recogidas en la Tabla 6.

### **Evaluación inmunohistoquímica.**

La determinación de la expresión del receptor de eritropoyetina en los especímenes seleccionados, clasificados según los criterios anteriores se realizó con un anticuerpo monoclonal de origen murino frente al dominio extracelular del citado receptor humano (Santa Cruz, CA, USA). Este

anticuerpo fue seleccionado entre un grupo heterogéneo de anticuerpos disponibles en el mercado porque ya había sido validado para inmunohistoquímica sobre tejido fijado en formaldehído e incluido en parafina. Además, en el momento de realizar el diseño del estudio era el único que había demostrado reactividad frente al dominio extracelular del receptor de eritropoyetina. La necesidad de determinar la expresión de este dominio dentro de la célula tumoral era fundamental para asumir razonablemente su funcionalidad, sin la cual la fiabilidad de cualquier tipo de correlación que pudiera emanar del estudio podría quedar en entredicho.

La segunda capa empleada fue un anticuerpo monoclonal frente a Fc murina marcada con peroxidasa. Previamente al inicio de la técnica se procedió a la desparafinización de los cortes de 5 micras de los especímenes mediante xilol a concentraciones decrecientes y posteriormente rehidratación con alcohol a concentraciones igualmente decrecientes. En un segundo paso se procedió al desenmascaramiento antigénico en olla a presión y finalmente se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  según los protocolos habituales del Departamento de Anatomía Patológica. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda una noche y la segunda capa durante 1 hora tras lavar con PBS tres veces. Por último, el revelado se realizó con DAB a concentraciones habituales en cualquier Servicio de Anatomía Patológica.

Se empleó como control interno positivo la intensidad de tinción del endotelio vascular y como control interno negativo las fibras de músculo liso vesical. Se utilizó como control externo positivo la tinción de células del túbulo contorneado proximal de riñón humano normal que se obtuvo del fondo tisular del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz y

como controles externos negativos el túbulo contorneado distal de estos especímenes así como un espécimen incubado con PBS, otro incubado solamente con la primera capa y otro incubado sólo con la segunda capa.

La gradación de la tinción se adecuó a los controles positivos y negativos, asignándose 0 a una tinción similar a los controles negativos (Figura 9) y 1 a una tinción similar al control positivo (figura 10). El control positivo externo fue utilizado para determinar la fiabilidad de la reactividad del anticuerpo primario.

Los procedimientos descritos en esta sección fueron supervisados y evaluados por un patólogo experto en el análisis inmunohistoquímico y corroborados por otro patólogo independiente.

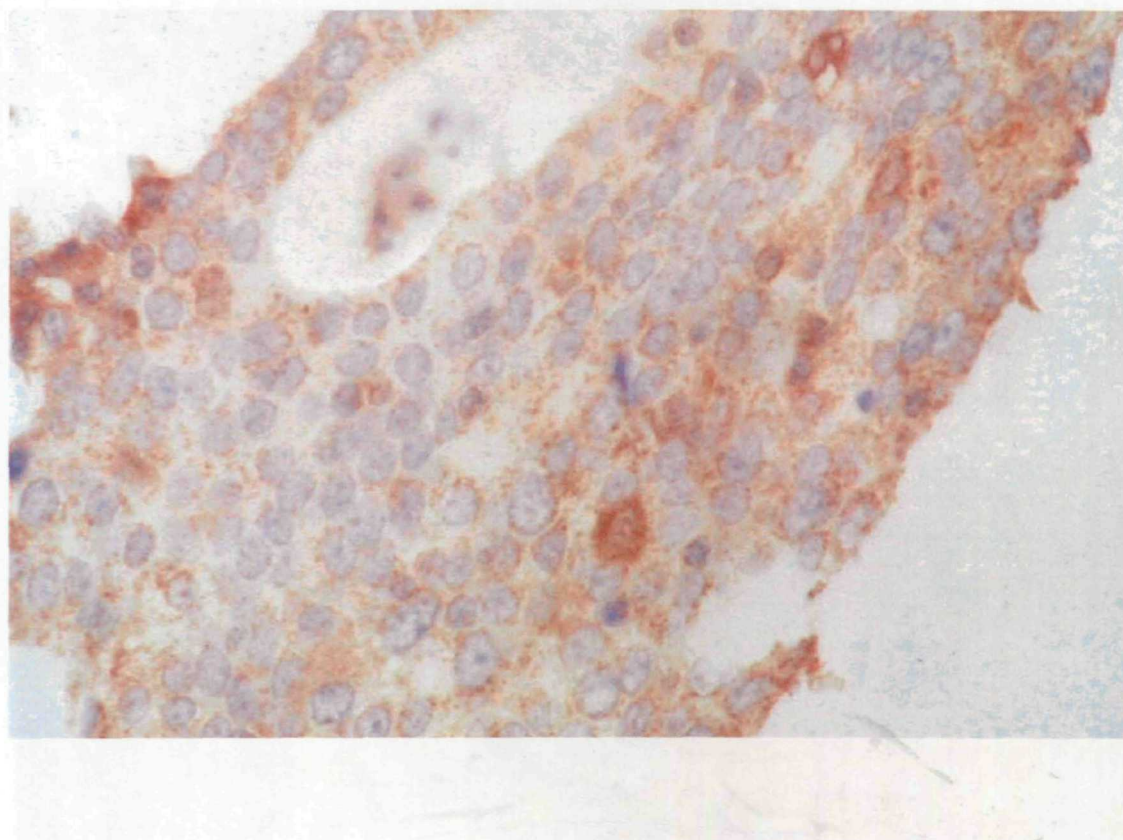
### **Seguimiento clínico y variables analizadas.**

Las historias clínicas custodiadas en el Servicio de Documentación Clínica del Hospital Universitario La Paz fueron la fuente para el seguimiento clínico y para la recogida de variables histopatológicas de cada uno de los pacientes estudiados. Todos los enfermos incluidos pudieron someterse a seguimiento clínico durante un periodo no inferior a los 16 meses.

Las dos variables principales sobre las que se fundamentó el estudio fueron: la expresión del receptor de eritropoyetina humana (EPOR) y la supervivencia global. Sin embargo, en el diseño del estudio se incluyeron la mayoría de las variables (hasta un total de 15) que se han sugerido como factores pronóstico de evolución clínica de los carcinoma de vejiga de células transicionales

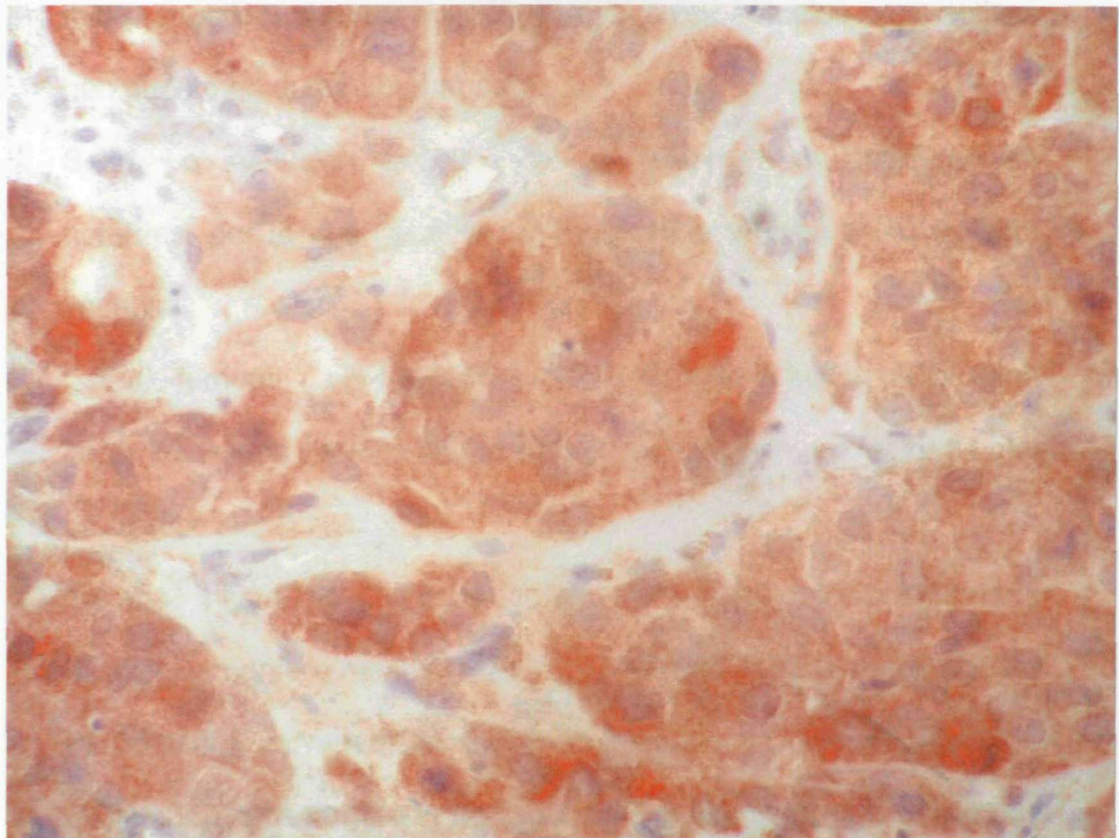


**Fig 9.- Inmunotinción negativa de EPOR.-** Preparación observada con  
objetivo x40



Para facilitar su análisis, las variables fueron agrupadas exclusivamente con fines lógicos en clínicas, clínicas y patológicas (Tablas 2, 3 y 4 respectivamente). En todas ellas, las relaciones se mantuvieron como constantes la presencia/ausencia de expresión del dominio extracelular del receptor de eritropoyetina en las células tumorales de neoplasias de vejiga.

**Fig 10.- Inmunotinción positiva de EPOR.-** Preparación observada con objetivo x40 con clara positividad nuclear



(Supervivencia Global), la supervivencia global y la supervivencia

hasta la forma de muerte.

Exclus durante el seguimiento.

Para facilitar su análisis, las variables fueron agrupadas, exclusivamente con fines logísticos en globales, clínicas y patológicas (Tablas 2, 3 Y 4 respectivamente). En todas estas agrupaciones se mantiene como constante la presencia/ausencia de expresión del dominio extracelular del receptor de eritropoyetina en las células tumorales de neoplasias de vejiga resecadas, ya que es la variable central de nuestro estudio.

Se agrupan como globales: Edad, Sexo, Estadío, Tiempo de recaída, Supervivencia Global y Exitus

- Edad: La edad avanzada al diagnóstico se ha definido como factor de mal pronóstico, aunque los datos de diversos estudios prospectivos han puesto en duda esta relación
- Sexo. La evolución clínica suele ser peor en mujeres que en hombres, por lo que se consideró necesaria la evaluación de esta variable.
- Estadío tumoral. La penetración del tumor desde el lumen de la vejiga hacia los tejidos internos habitualmente se considera un factor de mal pronóstico
- Tiempo hasta la recaída local y a distancia, confirmada histológicamente o mediante métodos de imagen irrefutables (TAC o PET-TAC). Esta variable se midió en meses.
- El tiempo hasta la muerte de cada uno de los pacientes evaluados (Supervivencia Global), determinada en meses desde el diagnóstico hasta la fecha de muerte.
- Exitus durante el seguimiento clínico.

Se agrupan como clínicas las siguientes variables: Supervivencia global, Hematuria, Obstrucción Uretral y Citología

- Supervivencia Global, ya citada.
- Presencia o ausencia de hematuria al diagnóstico
- Obstrucción uretral al diagnóstico. Este evento se correlaciona con la T, sin embargo algunos estudios multivariantes le han asignado un valor independiente de mal pronóstico.
- Historia previa de neoplasias malignas de cualquier otro origen, excluyendo tumores malignos de piel no melanoma intervenido más allá de cinco años previos a la intervención quirúrgica y, en mujeres, carcinoma in situ de cérvix no irradiado. Esta variable se determinó con el objetivo de evitar factores de confusión asociado a la presencia de otros tumores como posibles responsables de la evolución clínica observada
- Positividad en la citología urinaria. Este parámetro se ha sugerido como factor pronóstico en términos de supervivencia. Se determinó positividad en el estudio de extensión frente a negatividad.

Se agrupan como patológicas: Estadío, Crecimiento tumoral formado estructuras papilares, carcinoma in situ asociado, displasia de la mucosa circundante, presencia de nidos de von Brunn y la presencia de infiltración linfocitaria del tumor.

- Estadío
- Crecimiento papilar del tumor frente a otras arquitecturas.
- Asociación a carcinoma in situ: asociación frente a no asociación

- Grado de displasia asociado a la mucosa normal, ya que se ha relacionado con la posibilidad de recurrencia: se determinó presencia de displasia frente a ausencia de la misma.
- Presencia de nidos de von Brunn. Frecuentemente y como resultado de cambios proliferativos en la mucosa, ésta forma repliegues y cordones que pueden quedar por debajo del epitelio superficial. Estos nidos pueden presentar diversos grados de displasia y carcinoma in situ por lo que su presencia parece ser un factor de mal pronóstico. Se recogió la presencia frente a la ausencia.
- Presencia de linfocitos infiltrantes en el tumor. Esta variable está asociada a mejor pronóstico, aunque en diversos estudios su valor es contradictorio. Se recogió presencia de infiltración frente a ausencia.

**Procedimiento estadístico.**

Se empleó un análisis estadístico mediante los programas informáticos SPSS v 10.0 y G-Stat 2.0 bajo sistema operativo Windows Millenium.

Para comparar variables discretas dicotómicas se empleo el test de chi cuadrado y para muestras con frecuencias esperadas menores de 5 el test de Fisher con dos colas. La comparación de una variable continua frente a una dicotómica se realizó mediante el test de la t de Student. Una vez seleccionadas aquellas variables dicotómicas que ejercían un efecto significativo sobre la supervivencia y tras su representación mediante curvas de Kaplan-Meier, se analizó con una regresión de Cox por pasos la carga global que ejercía cada una de ellas. Además, este mismo análisis se empleó para determinar la modulación en términos pronósticos que nuestra variable principal ejercía sobre aquellas que resultaron como significativas en la regresión por pasos.

La significación estadística se estableció como una p inferior a 0.05 y todos los test de correlación se realizaron con dos colas. Para la chi cuadrado se emplearon dos grados de libertad.

## 4 – RESULTADOS



El carcinoma de vejiga es responsable de más de 140.000 muertes anuales y los tratamientos locales fundamentados en la cistectomía radical son, bajo ciertas circunstancias, la única posibilidad de curación. Sin embargo muchos pacientes desarrollarán enfermedad a distancia y morirán como consecuencia de ésta. Así se han establecido multitud de factores pronósticos para delimitar el riesgo de muerte de cada paciente. Estos factores incluyen características clínicas del paciente (edad, sexo, presencia de obstrucción uretral al diagnóstico, citología positiva al diagnóstico y presencia de hematuria al diagnóstico entre otros) y características patológicas de la neoplasia (estadio tumoral T, estado ganglionar, grado de diferenciación, presencia de estructuras papilares, presencia de carcinoma in situ asociado, presencia de displasia en la mucosa circundante a la neoplasia, presencia de nidos de Von Brunn y presencia de infiltración linfocitaria, entre otros). Además, en los últimos años se han incluido una serie de parámetros moleculares propios del tumor entre los que destacan la presencia de mutaciones de p53, alteraciones en la regulación del ciclo celular y de la capacidad de apoptosis. Sin embargo, a pesar de los ingentes datos moleculares, clínicos y patológicos, hoy día no es posible la determinación absoluta del riesgo de recaída y muerte por carcinoma de células transicionales de vejiga por lo que son necesarios nuevos estudios que permitan identificar nuevos parámetros a incluir en las clasificaciones de riesgo. Recientemente se ha demostrado que existe expresión del receptor de eritropoyetina humana en una amplia variedad de tumores humanos. Además, se ha sugerido desde modelos animales realizados con tumores que sobre-expresaban el receptor de eritropoyetina, que la presencia de esta proteína podría implicar aumento en la proliferación de las células tumorales e inducción



de angiogénesis. En relación con el carcinoma de vejiga sólo existen hasta el momento de la redacción de este trabajo de investigación dos artículos en los que se ha evaluado la presencia de mRNA de esta proteína. En estos dos trabajos se determinó la existencia de los citados transcritos en neoplasias vesicales dentro de un análisis de transcriptoma completo con fines descriptivos sin incluir la evolución como parámetro de comparación. Además, es conocida la regulación post-traducciona de la expresión de este receptor por lo que su determinación proteica y su localización subcelular es crítica para poder inferir su implicación biológica en proliferación tumoral. Por ello el objetivo fundamental del presente trabajo fue determinar la presencia del receptor de eritropoyetina humano en muestras tisulares de carcinoma de vejiga obtenidas tras cistectomías radicales y establecer su posible relación con la supervivencia global en los pacientes intervenidos.

Así, se ha evaluado de forma retrospectiva mediante inmunohistoquímica la presencia o ausencia de expresión del receptor humano de eritropoyetina (EPOR) en los especímenes tumorales de 75 pacientes sometidos a cistectomía radical por la presencia de un carcinoma urotelial de vejiga.

De las historias clínicas se han extraído 14 características de los pacientes y de sus neoplasias, que se han clasificado en tres grupos: globales, clínicas y patológicas (ver tablas 2, 3 y 4 respectivamente).

Tabla 2.- Características globales de los pacientes y sus neoplasias

Nº. PAC	EDAD	Sexo	EPOR	Estadio(T)	T RECAIDA	SUPERV	EXITUS
1	71	V	SI	pT4	5	6	SI
2	77	V	SI	pT4	3	5	SI
3	55	V	SI	pT3	3	6	SI
4	62	V	NO	pT2	22	22	NO
5	62	V	SI	pT3	10	12	SI
6	44	V	SI	pT2	4	6	SI
7	69	V	NO	pT4	22	22	NO
8	68	V	NO	pT3	22	22	NO
9	85	V	SI	pT3	4	6	SI
10	58	V	SI	pT4	3	5	SI
11	73	V	NO	pT2	9	11	SI
12	79	V	SI	pT4	3	6	SI
13	83	V	SI	pT4	22	22	NO
14	68	V	NO	pT1	22	22	NO
15	73	V	NO	pT2	20	20	NO
16	38	M	SI	pT3	22	22	NO
17	64	V	NO	pT2	22	22	NO
18	72	V	NO	pT2	18	18	NO
19	74	V	NO	pT2	21	21	NO
20	73	V	SI	pT4	12	12	SI
21	61	M	SI	pT2	7	10	SI
22	70	M	SI	pT3	3	5	SI
23	78	V	SI	pT2	3	5	SI
24	54	V	SI	pT3	4	7	SI
25	63	V	NO	pT2	22	22	NO
26	61	V	SI	pT3	9	12	SI
27	46	V	SI	pT1	4	6	SI
28	70	V	NO	pT4	22	22	NO
29	69	V	NO	pT4	22	22	NO
30	84	M	SI	pT3	3	6	SI
31	56	V	SI	pT4	2	5	SI
32	70	V	NO	pT1	10	15	NO
33	78	M	SI	pT3	3	6	SI
34	83	V	SI	pT3	8	12	SI
35	68	V	NO	pT1	22	22	NO
36	70	V	NO	pT1	20	20	NO
37	45	M	SI	pT4	10	16	NO
38	65	V	NO	pT2	22	22	NO
39	70	V	NO	pT1	10	18	NO
40	76	V	NO	pT2	21	21	NO
41	75	V	SI	pT3	8	15	NO
42	63	M	SI	pT2	7	13	SI
43	67	M	NO	pT3	4	6	SI
44	67	M	SI	pT4	3	5	SI
45	65	M	SI	pT4	2	5	SI
46	72	V	NO	pT2	22	22	NO
47	72	V	SI	pT4	10	15	NO
48	74	V	SI	pT2	2	5	SI
49	69	V	NO	pT4	24	24	NO
50	66	V	NO	pT3	23	23	NO
51	75	M	SI	pT3	3	6	SI
52	78	V	NO	pT4	2	4	SI
53	63	V	NO	pT1	5	10	SI
54	69	M	NO	pT4	4	7	SI
55	53	V	SI	pT4	23	23	NO
56	58	V	SI	pT1	23	23	NO
57	73	V	NO	pT2	21	21	NO
58	65	M	SI	pT3	23	23	NO
59	64	V	SI	pT2	23	23	NO
60	70	V	NO	pT1	19	19	NO
61	71	V	SI	pT1	23	23	NO
62	73	V	SI	pT4	6	10	SI
63	66	M	NO	pT2	5	11	SI
64	68	V	NO	pT3	5	12	SI
65	65	V	SI	pT4	2	5	SI
66	81	V	NO	pT3	22	22	NO
67	79	M	NO	pT2	22	22	NO
68	75	V	NO	pT3	21	21	NO
69	72	V	SI	pT2	22	22	NO
70	68	V	SI	pT1	22	22	NO
71	59	V	NO	pT3	9	17	NO
72	53	M	NO	pT3	23	23	NO
73	51	V	NO	pT4	5	13	SI
74	65	V	SI	pT2	4	11	SI
75	70	M	SI	pT4	4	11	SI

Tabla 3.- Características clínicas de los pacientes y sus neoplasias

N. PAC	EPOR	SUPERV	HEMATURIA	OBSTRUCCIÓN	CITOLOGÍA
1	SI	6	SI	NO	SI
2	SI	5	SI	NO	SI
3	SI	6	SI	NO	NO
4	NO	22	SI	NO	NO
5	SI	12	SI	NO	SI
6	SI	6	SI	NO	SI
7	NO	22	SI	NO	SI
8	NO	22	NO	NO	NO
9	SI	6	NO	NO	SI
10	SI	5	SI	NO	SI
11	NO	11	NO	NO	SI
12	SI	6	NO	SI	SI
13	SI	22	NO	NO	NO
14	NO	22	SI	NO	NO
15	NO	20	SI	NO	NO
16	SI	22	NO	NO	NO
17	NO	22	NO	NO	NO
18	NO	18	NO	NO	NO
19	NO	21	NO	NO	NO
20	SI	12	SI	NO	NO
21	SI	10	NO	NO	NO
22	SI	5	SI	SI	SI
23	SI	5	NO	SI	SI
24	SI	7	SI	SI	SI
25	NO	22	NO	NO	NO
26	SI	12	NO	NO	NO
27	SI	6	NO	SI	SI
28	NO	22	NO	NO	NO
29	NO	22	NO	NO	SI
30	SI	6	SI	SI	SI
31	SI	5	SI	NO	SI
32	NO	15	NO	SI	NO
33	SI	6	SI	SI	NO
34	SI	12	NO	SI	SI
35	NO	22	NO	NO	SI
36	NO	20	NO	NO	SI
37	SI	16	SI	NO	NO
38	NO	22	NO	NO	NO
39	NO	18	NO	NO	SI
40	NO	21	NO	NO	NO
41	SI	15	NO	NO	NO
42	SI	13	SI	NO	NO
43	NO	6	NO	SI	SI
44	SI	5	SI	NO	SI
45	SI	5	SI	SI	SI
46	NO	22	SI	NO	NO
47	SI	15	NO	NO	SI
48	SI	5	SI	SI	SI
49	NO	24	NO	NO	NO
50	NO	23	NO	NO	NO
51	SI	6	NO	NO	SI
52	NO	4	SI	SI	NO
53	NO	10	SI	NO	SI
54	NO	7	NO	SI	SI
55	SI	23	NO	NO	SI
56	SI	23	NO	NO	NO
57	NO	21	SI	NO	SI
58	SI	23	NO	NO	NO
59	SI	23	NO	NO	NO
60	NO	19	NO	NO	SI
61	SI	23	NO	NO	SI
62	SI	10	SI	NO	NO
63	NO	11	NO	NO	NO
64	NO	12	SI	NO	NO
65	SI	5	SI	SI	SI
66	NO	22	NO	NO	NO
67	NO	22	NO	NO	NO
68	NO	21	NO	NO	NO
69	SI	22	NO	NO	NO
70	SI	22	NO	NO	NO
71	NO	17	SI	NO	SI
72	NO	23	NO	NO	NO
73	NO	13	SI	NO	NO
74	SI	11	SI	SI	SI
75	SI	11	NO	NO	SI

Tabla 4.- Características patológicas de los pacientes y sus neoplasias

N. PAC	EPOR	T	PAPILAR	CIS ASOC	DISP ASOC	VON BRUNN	LINF INFILT
1	SI	pT4	SI	SI	NO	NO	NO
2	SI	pT4	SI	SI	NO	NO	NO
3	SI	pT3	SI	NO	NO	NO	SI
4	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
5	SI	pT3	SI	SI	NO	NO	NO
6	SI	pT2	NO	SI	SI	NO	NO
7	NO	pT4	NO	NO	NO	NO	NO
8	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
9	SI	pT3	NO	SI	NO	NO	NO
10	SI	pT4	NO	SI	NO	NO	NO
11	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	SI
12	SI	pT4	SI	SI	NO	NO	NO
13	SI	pT4	NO	NO	NO	NO	NO
14	NO	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
15	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
16	SI	pT3	NO	NO	SI	NO	SI
17	NO	pT2	NO	SI	NO	NO	SI
18	NO	pT2	NO	SI	NO	NO	SI
19	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	SI
20	SI	pT4	NO	NO	NO	NO	SI
21	SI	pT2	SI	SI	NO	NO	NO
22	SI	pT3	SI	SI	SI	NO	SI
23	SI	pT2	SI	SI	SI	NO	NO
24	SI	pT3	NO	NO	SI	NO	NO
25	NO	pT2	SI	NO	NO	NO	NO
26	SI	pT3	SI	NO	SI	NO	NO
27	SI	pT1	SI	SI	SI	NO	NO
28	NO	pT4	NO	NO	SI	NO	NO
29	NO	pT4	NO	NO	NO	NO	SI
30	SI	pT3	NO	SI	SI	NO	NO
31	SI	pT4	SI	SI	SI	SI	NO
32	NO	pT1	NO	NO	SI	NO	NO
33	SI	pT3	SI	SI	SI	NO	NO
34	SI	pT3	NO	SI	SI	SI	NO
35	NO	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
36	NO	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
37	SI	pT4	NO	NO	SI	NO	NO
38	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
39	NO	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
40	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	SI
41	SI	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
42	SI	pT2	NO	SI	NO	NO	NO
43	NO	pT3	SI	SI	NO	NO	NO
44	SI	pT4	SI	SI	NO	NO	NO
45	SI	pT4	SI	SI	SI	NO	NO
46	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
47	SI	pT4	NO	SI	NO	NO	NO
48	SI	pT2	SI	SI	SI	NO	NO
49	NO	pT4	NO	NO	NO	NO	NO
50	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	SI
51	SI	pT3	SI	SI	SI	SI	NO
52	NO	pT4	SI	SI	SI	NO	SI
53	NO	pT1	SI	NO	NO	NO	SI
54	NO	pT4	SI	SI	SI	SI	SI
55	SI	pT4	NO	NO	NO	NO	SI
56	SI	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
57	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	SI
58	SI	pT3	NO	NO	NO	NO	SI
59	SI	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
60	NO	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
61	SI	pT1	NO	NO	NO	NO	SI
62	SI	pT4	NO	SI	NO	NO	SI
63	NO	pT2	SI	SI	NO	NO	NO
64	NO	pT3	SI	NO	NO	NO	SI
65	SI	pT4	SI	SI	SI	NO	NO
66	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
67	NO	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
68	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
69	SI	pT2	NO	NO	NO	NO	NO
70	SI	pT1	NO	NO	NO	NO	NO
71	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
72	NO	pT3	NO	NO	NO	NO	NO
73	NO	pT4	NO	SI	NO	NO	SI
74	SI	pT2	SI	SI	SI	NO	NO
75	SI	pT4	SI	SI	NO	NO	NO

Se ha analizado cada una de estas características en relación con la expresión del EPOR. Todos los pacientes fueron seleccionados con grado 3 de diferenciación para evitar la confusión en términos pronósticos que puede ejercer este parámetro. Además se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes con afectación ganglionar ya que la presencia de esta característica genera un tremendo influjo sobre la probabilidad de muerte, lo cual limitaba claramente el número de eventos que se podían producir y, por tanto podía obscurecer el verdadero impacto de las variables analizadas.

### 1.- Expresión del receptor de eritropoyetina (EPOR).-

De los 75 pacientes estudiados 40 expresaron el receptor de eritropoyetina (EPOR+), lo que supone un 53,3%, y 35 no lo expresaron (EPOR-), lo que supone un 46,7%. Entre los pacientes que expresaron EPOR, 28 eran **hombres** (70%) y 12 eran mujeres (30%), de los que no lo expresaron 30 eran hombres (85,71%) y 5 mujeres (14,29%). No existe, mediante el test de Fisher de 2 colas, asociación estadística entre la expresión de EPOR y el sexo ( $p=0,1662$ ). La media de **supervivencia** entre los EPOR+ fue de 11,45 meses, mientras que entre los EPOR- fue 18,31 meses. De los 40 EPOR+, 12 (30%) presentaban **estadios** pT1 o pT2 y 28 presentaban estadios más avanzados (70%). Entre los 35 que no expresaban EPOR, 20 presentaban estadios pT1 o pT2 (57,14%) y 15 presentaban estadios superiores (42,86%)(Tabla 5). El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los EPOR+ fue de 8,92 meses y en los EPOR- de 16,71 meses, lo que revela, tras el análisis de los datos mediante el test de la t de Student ( $t= 0,853$ ), que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ) entre los tiempos de recidiva de los

**Tabla 5.- Relación entre el estadio del tumor y las diferentes variables estudiadas en 75 pacientes de carcinoma de vejiga**

	HEMATURIA +	HEMATURIA -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 5,4739 p = 0,1402  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y hematuria al diagnóstico
pT4	13	9	
pT3	8	13	
pT2	8	13	
pT1	2	9	

	OBST. URET. +	OBST. URET -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 1,3677 p = 0,7131  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y presencia de obstrucción uretral al diagnóstico
pT4	5	17	
pT3	6	15	
pT2	3	18	
pT1	2	9	

	E. PAPILAR +	E. PAPILAR -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 2,9037 p = 0,4067  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y presencia de estructuras papilares
pT4	10	12	
pT3	8	13	
pT2	6	15	
pT1	2	9	

	CIS asoc. +	CIS asoc. -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 9,2037 p= 0,0267  Existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y presencia CIS asociado
pT4	14	8	
pT3	8	13	
pT2	9	12	
pT1	1	10	

	DISPLASIA +	DISPLASIA -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 2,5815 p= 0,4607  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y la asociación de displasia de la mucosa
pT4	7	15	
pT3	8	13	
pT2	4	17	
pT1	2	9	

	VON BRUNN +	VON BRUNN -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 3,1484 p= 0,3693  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y presencia de estructuras de von Brunn
pT4	2	20	
pT3	2	19	
pT2	0	21	
pT1	0	11	

	CITOLOGÍA +	CITOLOGÍA -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 6,6309 p= 0,0846  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y la positividad de la citología
pT4	14	8	
pT3	9	12	
pT2	6	15	
pT1	7	4	

	EPOR +	EPOR -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 6,6309 p= 0,122  No existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y el receptor de eritropoyetina
pT4	15	7	
pT3	13	8	
pT2	8	13	
pT1	4	7	

	EXITUS +	EXITUS -	Estadístico de contraste Chi-Cuadrado = 4,5919 p= 0,0321  Existe relación estadísticamente significativa entre el estadio y la muerte del paciente
Avanzado	14	8	
Localizado	9	12	



pacientes que expresan EPOR frente a los que no lo expresan (Tabla 6). De los 40 EPOR+, 20 presentaron **hematuria** al diagnóstico (50%) y otros 20 no la presentaron, y entre los EPOR-, 11 presentaron hematuria (31,43%) y 24 no la presentaron (68,57%). Cuando se analizan estos datos, mediante el test de Fisher de 2 colas, se obtiene una  $p=0,1581$ , lo que indica que no existe relación estadísticamente significativa entre la hematuria y la expresión de EPOR (Tabla 7). Presentaron **obstrucción uretral** 12 de los 40 EPOR+ (30%) y 28 (70%) no la presentaron. Entre los EPOR- , 4 presentaron obstrucción (11,43%) y 31 no la presentaron (88,57%). No existe relación estadísticamente significativa suficiente ( $p=0,0882$ ) entre la expresión de EPOR y la obstrucción uretral cuando los resultados se enfrentan a través del test de Fisher con 2 colas (Tabla 7). Entre los EPOR+, presentaron **estructuras papilares** 19 (47,5%) y 21 no las presentaron (52,5%) y entre los EPOR-, 7 presentaron estructuras papilares (20%) y 28 no las presentaron (80%). Existe una asociación estadística significativa ( $p=0,0158$ ) entre la expresión de EPOR y la presencia de estructuras papilares cuando se analizan los datos mediante el test de Fisher con 2 colas (Tabla 7). Del total de pacientes con EPOR+, 25 presentaron **CIS asociado** (62,5%) y entre los EPOR-, 7 presentaron CIS asociado (20%), datos que sometidos al test de Fisher con 2 colas revelan una asociación estadística fuertemente significativa ( $p=0,0004$ ) entre los pacientes que expresan EPOR y la presencia de CIS asociado (Tabla 7). Presentaron **displasia de la mucosa** 17 pacientes del total con EPOR+ (42,5%) y 4 del total con EPOR- (11,43%), lo que revela, al aplicar el test de Fisher de 2 colas, una asociación estadística muy significativa ( $p=0,0041$ ) entre la expresión de EPOR y la presencia de

**Tabla 6.- Relación entre expresión de EPOR y tiempo de recaída**

	EPOR +	EPOR -	Existe diferencia estadísticamente significativa
T. Recaída (media)	8,93	16,71	t = 0,853 p < 0,001

**Tabla 7 - Asociaciones entre la expresión de EPOR y otras variables**

	<b>T REC</b>	<b>PAPILAR</b>	<b>CIS ASOC</b>	<b>DISP ASOC</b>	<b>CITOLOGÍA +</b>	<b>EXITUS</b>
<b>Expresión de EPOR</b>	<b>SI P&lt;0,001</b>	<b>SI P=0,0158</b>	<b>SI P=0,0004</b>	<b>SI P=0,0041</b>	<b>SI P=0,0372</b>	<b>SI p&lt;0,0001</b>

Asociación inversa

	<b>HEMA TURIA</b>	<b>OBST. URETRAL</b>	<b>VON BRUMM</b>	<b>INF. LINFOC.</b>
<b>Expresión de EPOR</b>	<b>NO P=0,1581</b>	<b>NO P=0,0882</b>	<b>NO P=0,6182</b>	<b>NO P=0,1253</b>

displasia asociada (Tabla 7). Entre los pacientes que expresaban EPOR, se observaron **nidos de von Brunn** en 3 pacientes (7,5%) y entre los que no expresaban EPOR, se observaron en 1 (2,86%). No existe asociación con significación estadística ( $p= 0.6182$ ) entre la expresión de EPOR y la observación de nidos de von Brunn cuando se analizan mediante el test de Fisher de 2 colas (Tabla 7). La **citología** fue positiva en 24 de los pacientes con EPOR+ (60%) y en 12 de los pacientes con EPOR- (34,29%). Estos datos indican que existe asociación estadísticamente significativa ( $p= 0,0372$ , test de Fisher de 2 colas) entre la expresión de EPOR y la positividad en la citología al diagnóstico (Tabla 7). Presentaron **infiltración linfocitaria** 8 de los pacientes con EPOR+ (20%) Y 13 de los pacientes con EPOR- (37,14%). No existe relación estadísticamente significativa ( $p= 0,125$ ), mediante el test de Fisher con 2 colas, entre la expresión de EPOR y la presencia de infiltración linfocitaria (Tabla 7). Durante la realización de este estudio **murieron** 28 de los 40 pacientes EPOR+ (70%) Y 8 de los 35 pacientes EPOR- (22,86%). Existe una relación estadística fuertemente significativa ( $p<0,0001$ ) entre la expresión de EPOR y la muerte de los pacientes, al aplicar el test de Fisher con 2 colas (Tabla 7)

## 2.- Supervivencia global.

La media de supervivencia entre los pacientes estudiados fue de 14,65 meses (4-24) y la mediana de 15. De los pacientes estudiados 36 tuvieron una supervivencia menor de 15 meses y 39 superaron los 15

meses. El EPOR se expresó en 40 pacientes, 28 de los cuales pertenecían al grupo de menor supervivencia y 12 al de mayor.

La supervivencia global varió en relación con las distintas variables analizadas. Así, aquellos pacientes que expresaban el receptor de eritropoyetina tuvieron una menor supervivencia que aquellos en los que no fue detectable su expresión en la membrana citoplasmática de las células neoplásica ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 8) Tal y como se observa en la curva de supervivencia obtenida por el método de Kaplan-Meier (Figura 11) aquellos pacientes que expresaban el receptor tuvieron una mediana de supervivencia de 10 meses (IC 95% 4-16) y una media de supervivencia de 12 meses (IC 95% 10- 14 meses). En los pacientes que no expresaron el receptor en la membrana a los 24 meses de seguimiento no se había alcanzado la mediana de supervivencia.

La supervivencia global también se analizó en función de las otras variables secundarias que se habían recogido en cada paciente. Así, los pacientes que presentaron hematuria al diagnóstico tuvieron una mediana de supervivencia de 10 meses (IC 95% 6- 14 meses) siendo la media de supervivencia de 11 meses (IC 95% 9- 14 meses). Por el contrario aquellos que no presentaron hematuria al diagnóstico no alcanzaron la mediana de supervivencia a los 24 meses de seguimiento (Figura 12). Por ello, se confirmó que la presencia de hematuria al diagnóstico se correlaciona con una menor supervivencia ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 8)

En relación con la obstrucción uretral, los pacientes que la presentaron tuvieron una mediana de supervivencia de 6 meses (IC 95% 5- 7 meses), con una media de supervivencia de 7 meses (IC 95% 5-8 meses). Frente a ellos,

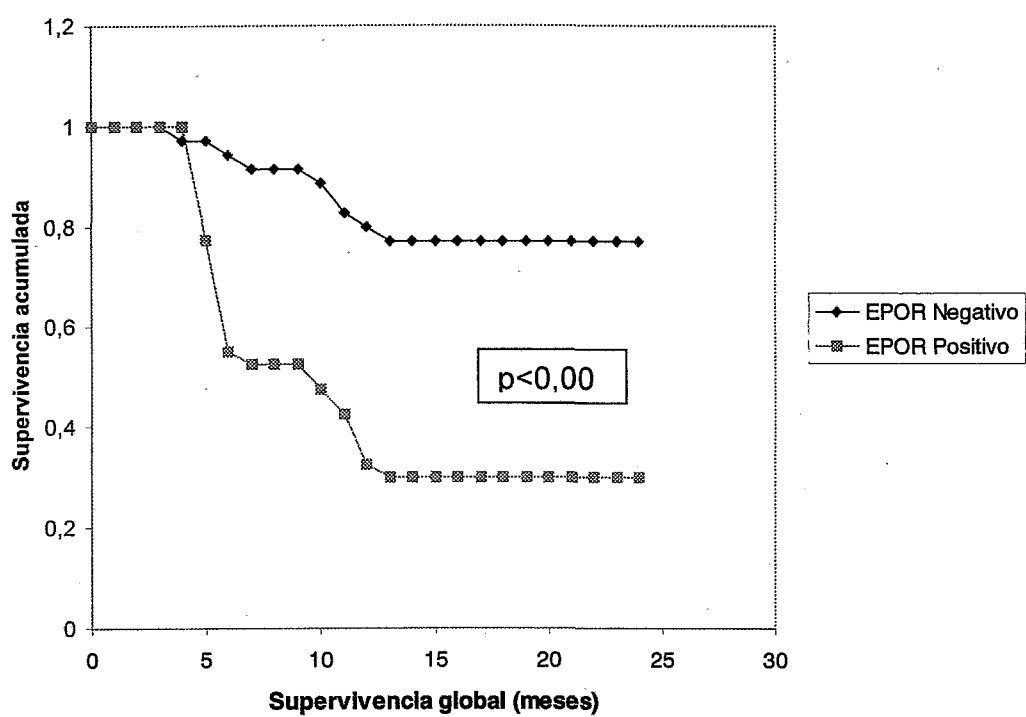
**Tabla 8 - Asociaciones inversas entre la supervivencia global y diversas variables**

	EPOR	HEMATURIA	OBSTR. URETRAL	PAPILAR
<b>Supervivencia global</b>	<b>p&lt;0,0001</b>	<b>p&lt; 0.0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>

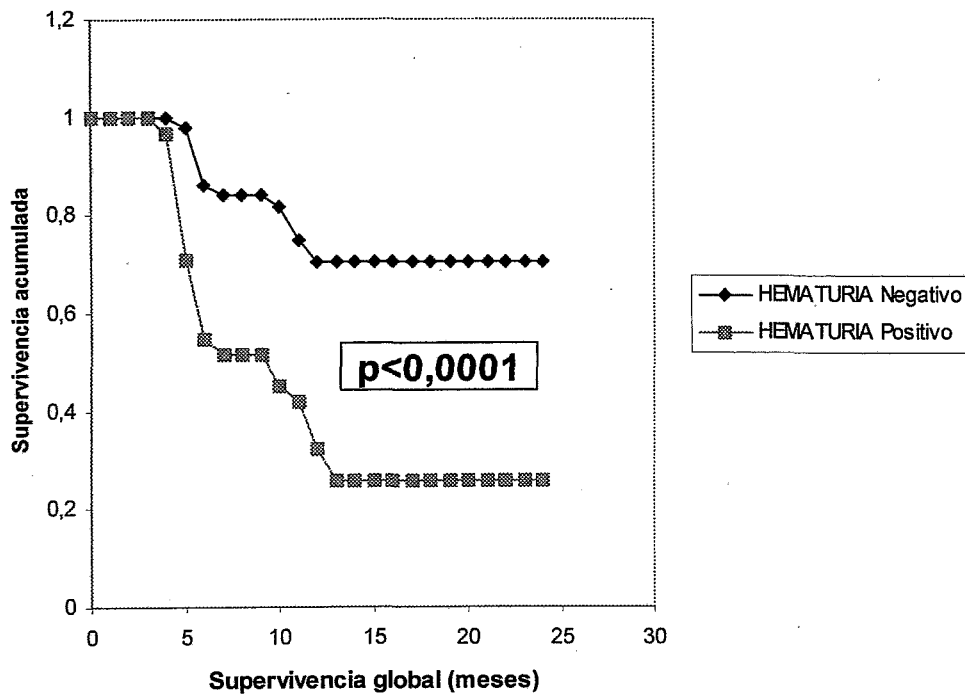
	CIS	DISPLASIA	NIDOS VON BRUMM	CITOLOGÍA
<b>Supervivencia global</b>	<b>p&lt;0,0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>	<b>p=0,0117</b>	<b>p=0,0001</b>

	INFILTR. LINFOC.
<b>Supervivencia global</b>	<b>0,8299</b>

**Figura 11.- Análisis de la supervivencia en función de EPOR**



**Figura 12.- Análisis de supervivencia en función de la hematuria**





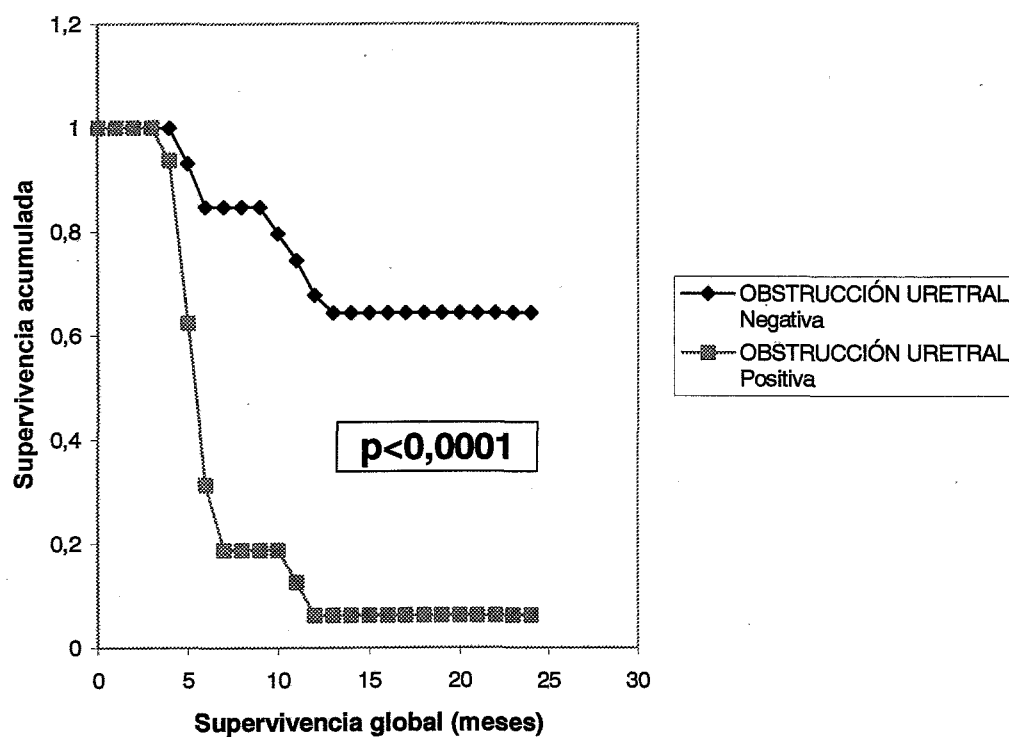
los que no presentaron obstrucción uretral no alcanzaron la mediana de supervivencia a los 24 meses de seguimiento.(Figura 13). Y estos datos ratifican que la presencia de obstrucción uretral se correlaciona con una supervivencia global menor ( $p<0,0001$ )(Tabla 8)

Otra variable estudiada en relación con la supervivencia fue la presencia de crecimiento papilar. Los pacientes que presentaban estas estructuras tuvieron una mediana de supervivencia de 6 meses (IC 95% 5-7 meses), con una media de supervivencia de 8 meses (IC 95% 6-9 meses), mientras que los que no presentaban estructuras papilares no alcanzaron la mediana de supervivencia al cabo de 24 meses de seguimiento (Figura 14). Con estos datos se confirma que existe una asociación inversa estadísticamente significativa entre la presencia de estructuras papilares y la supervivencia ( $p<0,0001$ ) (Tabla 8), cuando se someten al test de Kaplan-Meier

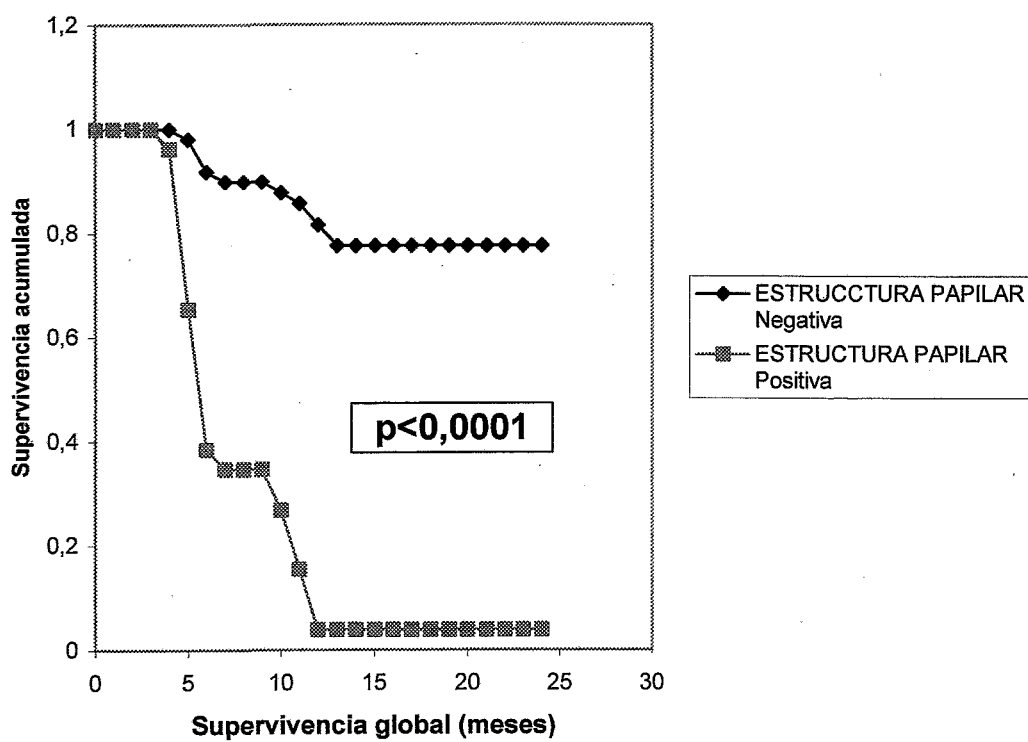
También se analizó la supervivencia en relación con la presencia de CIS asociado, encontrando una mediana de supervivencia de 6 meses (IC 95% 5-7 meses) y una media de 9 meses (IC 95% 7-10 meses) entre los pacientes que presentaban CIS asociado, mientras que los que no presentaron CIS asociado no alcanzaron la mediana de supervivencia, como se aprecia en la Tabla de Kaplan-Meier de análisis de supervivencia. (Figura 15) lo que supone que existe una correlación estadísticamente significativa inversa ( $p<0,0001$ ) entre la presencia de CIS y la supervivencia global (Tabla 8).

Entre los pacientes que presentaron displasia en la mucosa circundante se encontró una mediana de supervivencia de 6 meses (IC 95%

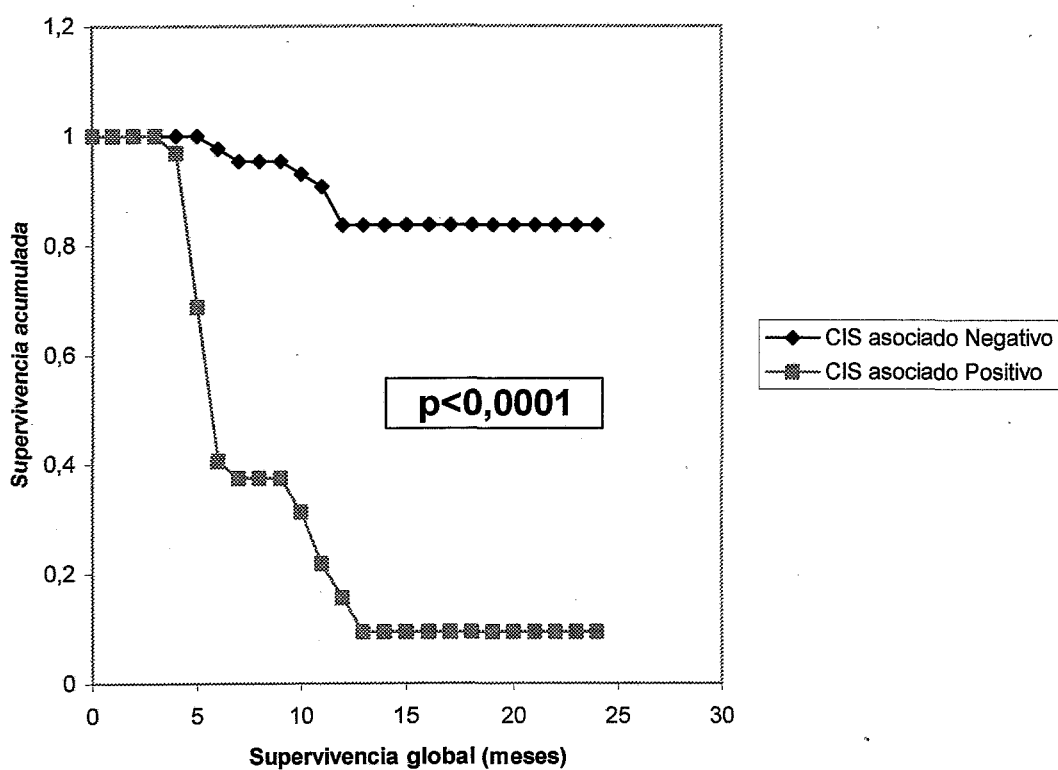
**Figura 13.- Análisis de supervivencia en función de la presencia de obstrucción uretral**



**Figura 14.- Análisis de supervivencia en función de la presencia de estructuras papilares**



**Figura 15.- Análisis de supervivencia en función de la presencia de CIS asociado**



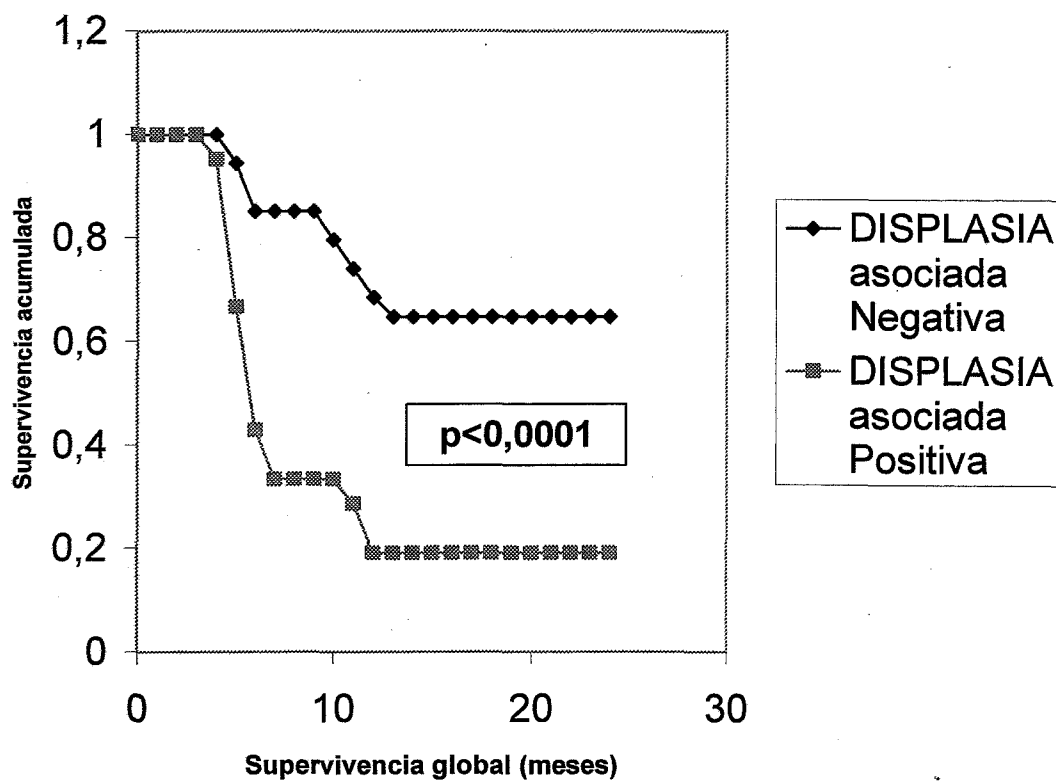
5-7 meses) con una media de supervivencia de 10 meses (IC 95% 7-12 meses), mientras que los que no presentaron esta alteración no alcanzaron la mediana de supervivencia (Figura 16). Se encontró que entre los 2 grupos existe una asociación inversa estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 8).

Se analizó la relación entre la supervivencia y la observación de nidos de von Brunn, apreciándose una mediana de supervivencia de 6 meses (IC 95% 4-8) y una media de supervivencia de 8 meses (IC 95% 4-11) entre los pacientes que presentaban nidos de von Brunn. Por el contrario, en los que no presentaban estas estructuras, no se alcanzó la mediana de supervivencia (Figura 17), lo que evidencia, al aplicar el test de Kaplan-Meier, una asociación estadísticamente significativa ( $p = 0,0117$ ) entre la presencia de nidos de von Brunn y una menor supervivencia (Tabla 8).

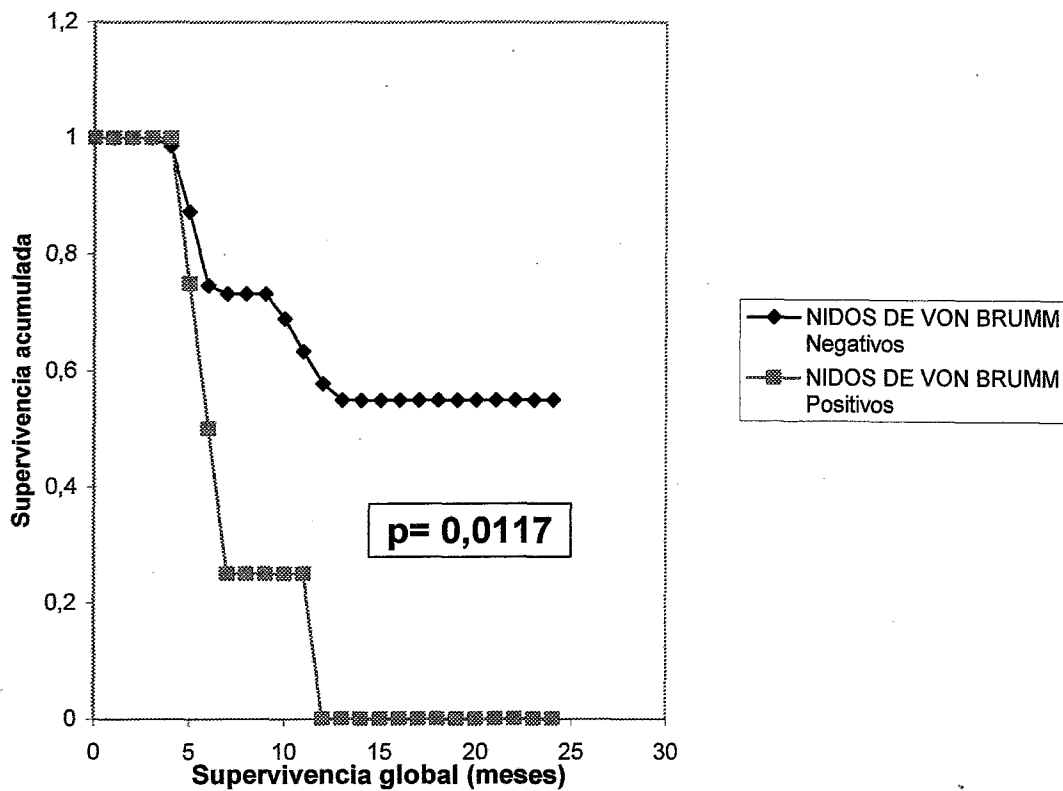
Al analizar la supervivencia en relación con la positividad de la citología urinaria al diagnóstico, se observó que los pacientes con citología positiva tuvieron una mediana de supervivencia de 7 meses (IC 95% 4-10), con una media de supervivencia de 12 meses (IC 95% 9-14 meses). Sin embargo los que no tuvieron un citología urinaria con semiología de malignidad, no llegaron a alcanzar la mediana de supervivencia a los 24 meses de seguimiento (Figura 18). Aplicado el test de Kaplan-Meier de análisis de supervivencia, se concluye que existe una fuerte correlación ( $p = 0,0001$ ) entre la positividad de la citología y una menor supervivencia (Tabla 8).

También se estudió la relación de la infiltración linfocitaria con la supervivencia, encontrándose que ni en los pacientes que presentaron infiltración ni en los que no la presentaron se alcanzaba la mediana de

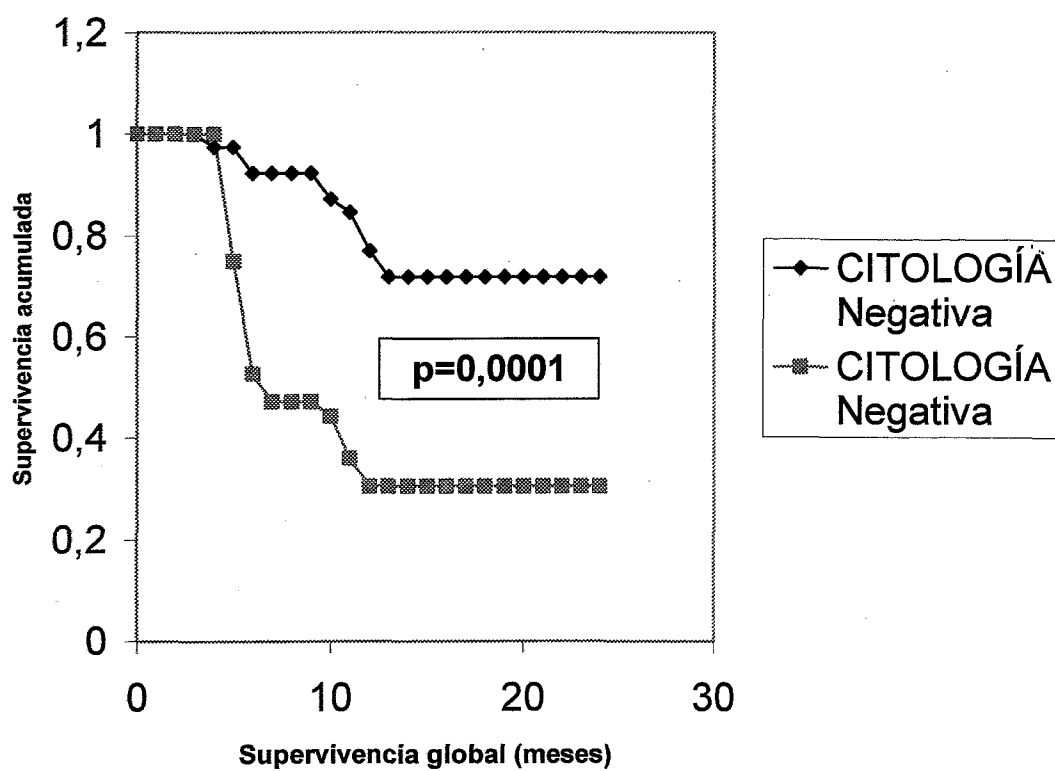
**Figura 16.- Análisis de supervivencia en función de la presencia de displasia asociada**



**Figura 17.- Análisis de supervivencia en función de la observación de nidos de von Brunn**



**Figura 18.- Análisis de la supervivencia en función de la positividad de la citología**

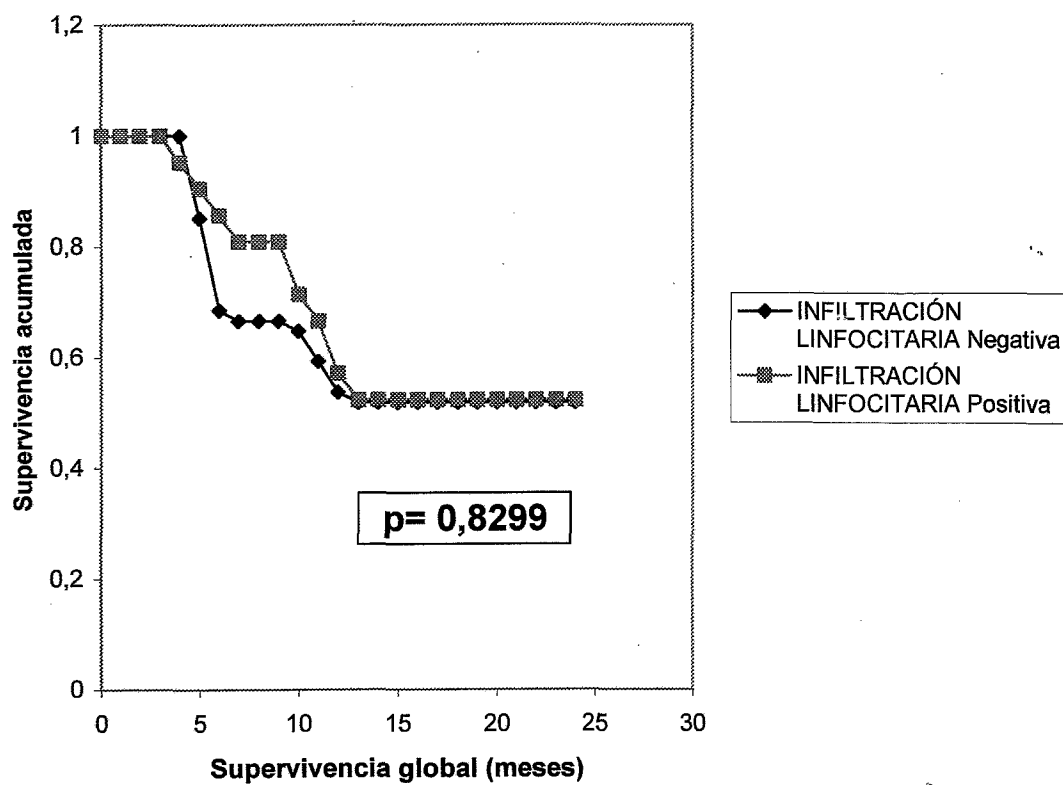




supervivencia) (Figura 19). No se aprecia correlación entre la supervivencia y la infiltración linfocitaria ( $p=0,8299$ ) (Tabla 8)

**3.- Sexo.-** Del total de pacientes, 58 eran hombres, lo que supone un 77,3%, y 17 mujeres, un 22,7% con una proporción 4.5:1. La media de **edad** entre los hombres fue de 68 años, mientras que entre las mujeres fue de 65,59 años. La media de **supervivencia** de los hombres fue de 15,55 meses, mientras que la de las mujeres fue 11,59 meses. De los 58 hombres, 28 presentaban **estadios** pT1 o pT2 (48,27%), mientras que los 30 restantes presentaban estadios pT3 o pT4 (51,73%) Entre las 17 mujeres, 4 presentaban estadios pT1 o pT2 (23,53%) y 13 presentaban estadios pT3 o pT4 (76,47%). El **tiempo de recidiva** medio en hombres fue de 13,69 meses, mientras que en mujeres fue de 8,70 meses. En relación con la **hematuria** al diagnóstico, 24 hombres y 7 mujeres la presentaron, lo que supone un 41,38% y un 41,18% respecto al total de hombres y mujeres respectivamente. Presentaron **obstrucción uretral** 10 hombres (17,24% del total de hombres) y 6 mujeres (35,29% de las mujeres). Presentaron **estructuras papilares** 16 hombres (27,59%) y 10 mujeres (58,82%). Presentaron **CIS asociado** 20 de los 58 hombres (34,48%) y 12 de las 17 mujeres (70,59%), Presentaron **displasia de la mucosa** 13 hombres (22,41%) y 8 mujeres (47,06%). Se observaron **nidos de von Brunn** en 2 hombres (3,45%) y en 2 mujeres (11,76%) Fueron positivas las **citologías** de 28 hombres (48,28%) y de 8 mujeres (47,06%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 17 hombres (29,31%) y 4 mujeres (23,53%). Durante la realización de este estudio **murieron** 24 hombres (41,38%) y 12 mujeres (70,59%).

**Figura 19.- Análisis de supervivencia en función de la infiltración linfocitaria**



**4.- Edad.-** La media de edad de los pacientes fue de 67,45 años (38-85 años), estando situada la mediana en 69 años. De forma aleatoria y a título descriptivo, se eligió como punto de corte 65 años. De los 75 pacientes, 48 eran mayores de 65 años y de ellos 21 expresaban EPOR y 27 eran menores de 65 años y de ellos 19 expresaban EPOR. Analizados estos datos mediante el test de Fisher con 2 colas, existía diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0321$ ) entre los mayores y los menores de 65 años.

**5.- Estadío (T).-** Todos los especímenes seleccionados presentaban grado 3 de diferenciación. De todos ellos 43 tenían tumores que invadían la serosa o más allá (pT3 y pT4) mientras que 32 tenían tumores en estadios más localizados (pT1-pT2). La media de **supervivencia** entre los pacientes de estadios más altos fue de 12,77 meses y entre los de estadios más bajos 17,19 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los de estadios más avanzados fue de 10,30 meses, mientras que en los de estadios localizados la media fue de 15,59. De los 43 pacientes con tumor en estadio avanzado, 21 presentaron **hematuria** al diagnóstico (48,84%) y entre los 32 con tumores localizados, 10 presentaron hematuria (31,25%). Presentaron **obstrucción uretral** 11 de los 43 pacientes con tumor en estadio avanzado (25,58%). Entre los de estadio localizado, 5 presentaron obstrucción (15,62%). Entre los de estadio más alto, presentaron **estructuras papilares** 18 (41,86%) y entre los de estadio localizado, 8 presentaron estructuras papilares (25%). Del total de pacientes con estadio elevado, 22 presentaron **CIS asociado** (51,16%) y entre los de estadios más bajos, 10 presentaron CIS asociado (31,25%). Presentaron **displasia de la mucosa** 15 pacientes del grupo con

estadio más alto (34,88%) y 6 del grupo de estadio más bajo (18,75%). Entre los pacientes del grupo de estadio más alto, se observaron **nidos de von Brunn** en 4 pacientes (9,3%) y entre los del grupo de estadio más bajo, no se observaron en ningún paciente. La **citología** fue positiva en 23 de los pacientes del grupo con mayor estadio (53,49%) y en 13 de los pacientes del grupo de menor estadio (40,62%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 13 de los pacientes del grupo con mayor estadio (30,23%) Y 8 de los pacientes del grupo con estadio más bajo (25%). Durante la realización de este estudio **murieron** 26 de los 43 pacientes del grupo con mayor estadio (60,46%) Y 10 de los 32 pacientes del grupo con estadios más bajos (31,25%).

**6.- Tiempo de recidiva.-** El tiempo transcurrido hasta la recidiva osciló entre 2 y 24 meses, con una media de 12,56 y una mediana de 10. El número de pacientes cuya recidiva fue menor o igual a 9 meses fue de 36, de los que 27 expresaron EPOR, y recidivaron después de 9 meses 39, de los que 13 expresaron EPOR. Analizada la expresión de EPOR en función del tiempo transcurrido hasta la recidiva, mediante el test de la t de Student, se observó una asociación inversa fuertemente significativa ( $p < 0,001$ ) entre ambos (Tabla 6)

**7.- Hematuria.-** Al diagnóstico 31 de los 75 pacientes presentaron hematuria, lo que supone un 41,33%, y 44 no la presentaron, lo que supone un 58,67 %. La media de **supervivencia** entre los pacientes hematóricos fue de 10,83 meses, mientras que entre los no hematóricos fue 17,34 meses. De los 31 pacientes con hematuria, 10 (32,26%) presentaban **estadios** pT1 o PT2

y 21 presentaban estadios más avanzados (67,74%). Entre los 44 no hematúricos, 22 presentaban estadios pT1 o pT2 (50%) y el otro 50% pertenecían a estadios superiores. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes con hematuria fue de 7,93 meses y en los no hematúricos de 15,82 meses. Presentaron **obstrucción uretral** 3 de los 31 hematúricos (29,03%). Entre los no hematúricos, 7 presentaron obstrucción (15,91%). Entre los pacientes hematúricos, presentaron **estructuras papilares** 15 (48,39%) y entre los no hematúricos, 11 presentaron estructuras papilares (25%). Del total de pacientes con hematuria, 18 presentaron **CIS asociado** (58,06%) y entre los no hematúricos, 14 presentaron CIS asociado (31,82%). Presentaron **displasia de la mucosa** 12 pacientes del total de pacientes con hematuria (38,71%) y 9 del total de pacientes no hematúricos (20,45%). Entre los pacientes hematúricos, se observaron **nidos de von Brunn** en 1 paciente (3,22%) y entre los no hematúricos, se observaron en 3 (6,82%). La **citología** fue positiva en 18 de los pacientes hematúricos (58,06%) y en 18 de los pacientes no hematúricos (40,91%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 9 de los pacientes hematúricos (29,03%) Y 12 de los pacientes no hematúricos (27,27%). Durante la realización de este estudio **murieron** 23 de los 31 pacientes hematúricos (74,19%) Y 13 de los 44 pacientes no hematúricos (29,54%).

**8.-Obstrucción uretral.-** De los 75 pacientes estudiados, solo 16 presentaron obstrucción uretral (21,33%). Los 59 restantes no presentaron obstrucción uretral (78,67%). La media de **supervivencia** entre los pacientes que presentaron obstrucción uretral fue de 6,94 meses, mientras que entre los

que no presentaron obstrucción fue 16,74 meses. De los 16 con obstrucción, 5 (31,25%) presentaban **estadios** pT1 o PT2 y 11 presentaban estadios más avanzados (68,75%). Entre los 59 que no presentaban obstrucción, 27 presentaban estadios pT1 o pT2 (45,76%) y 32 presentaban estadios superiores (54,24%). El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes con obstrucción fue de 3,81 meses y en los no obstruidos de 14,93 meses. Entre los pacientes con obstrucción uretral, presentaron **estructuras papilares** 12 (75%) y entre los no obstruidos, 14 presentaron estructuras papilares (23,73%). Del total de pacientes con obstrucción uretral, 14 presentaron **CIS asociado** (87,5%) y entre los no obstruidos, 18 presentaron CIS asociado (30,51%). Presentaron **displasia de la mucosa** 14 pacientes del total con obstrucción uretral (87,5%) y 7 del total de pacientes no obstruidos (11,86%). Entre los pacientes con obstrucción uretral, se observaron **nidos de von Brunn** en 2 pacientes (12,5%) y entre los no obstruidos, se observaron también en 2 pacientes (3,39%). La **citología** fue positiva en 13 de los pacientes con obstrucción (81,25%) y en 23 de los pacientes no obstruidos (38,98%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 3 de los pacientes con obstrucción uretral (18,75%) Y 18 de los pacientes no obstruidos (30,51%). Durante la realización de este estudio **murieron** 15 de los 16 pacientes con obstrucción uretral (93,75%) y 21 de los 59 pacientes no obstruidos (35,59%).

**9.- Estructuras papilares.-** Se han observado tumores con estructuras papilares en 26 de los 75 pacientes estudiados, que suponen el 34,67% y no se observaron en 49, que suponen el 65,33%. La media de **supervivencia** entre los pacientes que presentaban estructuras papilares fue de 7,85 meses,

mientras que entre los que no las presentaban la supervivencia media fue 18,26 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes que presentaron estructuras papilares fue de 4,69 meses y en los que no las presentaron de 16,73 meses. Del total de pacientes con estructuras papilares, 21 presentaron **CIS asociado** (80,77%) y entre los que no presentaron estructuras papilares, 11 presentaron CIS asociado (22,45%). Presentaron **displasia de la mucosa** 13 de los pacientes con estructuras papilares (50%) y 8 de los que no presentaban estructuras papilares (16,32%). Entre los pacientes con estructuras papilares, se observaron **nidos de von Brunn** en 3 pacientes (26,92%) y entre los que no las presentaban, se observaron nidos de von Brunn en 1 (2,04%). La **citología** fue positiva en 18 de los pacientes con estructuras papilares (69,23%) y en 18 de los pacientes en los que no se apreciaba estructura papilar (36,73%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 6 de los pacientes con estructuras papilares (23,08%) Y 15 de los pacientes en los que no se apreciaba estructura papilar (30,61%). Durante la realización de este estudio **murieron** 25 de los 26 pacientes con estructuras papilares (96,15%) y 11 de los 49 pacientes en los que no se apreciaba estructura papilar (22,45%).

**10.- CIS asociado.-** Presentaron CIS asociado 32 pacientes (42,67%) y 43 no lo presentaron. (57,33%). La media de **supervivencia** entre los pacientes con CIS asociado fue de 8,37 meses, mientras que entre los que no presentaban CIS asociado la supervivencia media fue 19,32 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes que presentaron CIS asociado fue de 5,25 meses y en los que no se asociaba CIS fue de 18 meses..

Presentaron **displasia de la mucosa** 15 de los pacientes con CIS asociado (46,87%) y 6 de los que no presentaban CIS asociado (13,95%). Entre los pacientes con CIS asociado, se observaron **nidos de von Brunn** en 4 pacientes (12,5%) y no se observaron nidos de von Brunn en los pacientes sin CIS asociado. La **citología** fue positiva en 23 de los pacientes con CIS asociado (71,87%) y en 13 de los pacientes en los que no se apreciaba CIS asociado (30,23%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 7 de los pacientes con CIS asociado (21,87%) Y 14 de los pacientes en los que no se apreciaba CIS asociado (32,56%). Durante la realización de este estudio **murieron** 29 de los 32 pacientes con CIS asociado (90,32%) y 7 de los 43 pacientes en los que no se apreciaba CIS asociado (16,28%).

**11.- Displasia asociada.-** De los 75 pacientes estudiados 21 presentaron displasia asociada al carcinoma original (28%) y 54 no presentaron displasia (72%). La media de **supervivencia** entre los pacientes con displasia asociada fue de 8,95 meses, mientras que entre los que no presentaban displasia asociada la supervivencia media fue 16,87 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes que presentaron displasia asociada fue de 6 meses y en los que no se asociaba displasia fue de 15,11 meses. Entre los pacientes con displasia asociada, se observaron **nidos de von Brunn** en 4 pacientes (19,05%) y no se observaron nidos de von Brunn en los pacientes sin displasia asociada. La **citología** fue positiva en 14 de los pacientes con displasia asociada (66,67%) y en 22 de los pacientes en los que no se apreciaba displasia asociada (40,74%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 4 de los pacientes con displasia asociada (19,05%) y 17 de los



pacientes en los que no se apreciaba displasia asociada (31,48%). Durante la realización de este estudio **murieron** 17 de los 21 pacientes con displasia asociada (80,95%) y 19 de los 54 pacientes en los que no se apreciaba displasia asociada (35,18%).

**12.- Nidos de von Brunn.-** De los 75 pacientes solo 4 presentaron nidos de von Brunn (5,3%). La media de **supervivencia** entre los pacientes con nidos de von Brunn fue de 7,5 meses, mientras que entre los que no presentaban nidos de von Brunn la supervivencia media fue 15,06 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes que presentaron nidos de von Brunn fue de 4,25 meses y en los que no se presentaban estas estructuras fue de 13,03 meses. La **citología** fue positiva en los 4 pacientes con nidos de von Brunn (100%) y en 32 de los pacientes en los que no se apreciaban nidos de von Brunn (45,07%). Presentaron **infiltración linfocitaria** 1 de los pacientes con nidos de von Brunn (25%) y 20 de los pacientes en los que no se apreciaban nidos de von Brunn (28,17%). Durante la realización de este estudio **murieron** los 4 pacientes con nidos de von Brunn (100%) y 32 de los 71 pacientes en los que no manifestaron estas estructuras (45,07%).

**13.- Citología.-** La citología resultó positiva en 36 de los 75 pacientes estudiados, lo que supone un 48%, y negativa en 39 pacientes, lo que equivale a un 52%. La media de **supervivencia** entre los pacientes con citología positiva fue de 11 meses, mientras que entre los que fue negativa, la supervivencia media fue 18,02 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes con citología positiva fue de 8,39 meses y en los que

tuvieron citología negativa fue de 16,41 meses. Presentaron **infiltración linfocitaria** 8 de los pacientes con citología positiva (22,22%) y 13 de los pacientes con citología negativa (33,33%). Durante la realización de este estudio **murieron** los 25 de los 36 pacientes con citología positiva (69,44%) y 11 de los 39 pacientes con citología negativa (28,20%).

**14.- Infiltración linfocitaria.-** Apareció infiltración linfocitaria en 21 de los 75 pacientes (28%) y no apareció en 54 pacientes (72%) La media de **supervivencia** entre los pacientes con infiltración linfocitaria positiva fue de 15,67 meses, mientras que entre los que fue negativa, la supervivencia media fue 14,26 meses. El tiempo medio transcurrido hasta la **recidiva** en los pacientes con infiltración linfocitaria fue de 13,95 meses y sin infiltración linfocitaria fue de 12,02 meses. Presentaron. Durante la realización de este estudio **murieron** los 10 de los 21 pacientes con infiltración linfocitaria (47,62%) y 26 de los 54 pacientes sin infiltración linfocitaria (48,15%).

**15.- Exitus.-** De los 75 pacientes estudiados, 36 murieron durante el estudio, lo que supone un 48% y 39 sobrevivieron, es decir un 52%.



Hemos evaluado, de forma retrospectiva, mediante inmunohistoquímica la expresión del receptor humano de eritropoyetina (EPOR) en 75 carcinomas de células transicionales de vejiga tras la cistectomía radical. En este grupo de pacientes, la expresión del citado receptor es un factor de mal pronóstico tanto en términos de supervivencia global ( $p < 0.0001$ ) como en tiempo hasta la recaída ( $p < 0.0001$ ). Este hecho confirma la hipótesis de partida de nuestro trabajo de investigación y, en nuestro conocimiento, es la primera vez que se evalúa esta circunstancia sobre neoplasias vesicales. Además, es la primera vez en la que determina la expresión mediante inmunohistoquímica de este receptor en este escenario oncológico. Sólo existen dos estudios (118-119) que han analizado la expresión de EPOR. Estos estudios emplearon microarrays de cDNA para evaluar la expresión del mRNA de EPOR en las neoplasias vesicales demostrando su expresión universal. Sin embargo la regulación en la expresión del receptor parece realizarse a través de cambios post-traduccionales, en los que la glicosilación podría jugar un papel crítico, por lo que la evaluación de la expresión proteica del dominio extracelular es de gran valor. Este hecho podría explicar la diferencia entre la cantidad de muestras en las que se detecta el dominio extracelular del receptor y la presencia de mRNA en todas las muestras analizadas por microarrays de cDNA.

Nuestros datos como factor pronóstico en términos de supervivencia global coinciden con los publicados por Acs et al en mujeres con carcinomas endometriales en los que su expresión a una menor supervivencia (133). Sin embargo, tanto en carcinomas papilares de tiroides se ha sugerido como factor de buen pronóstico (134) como en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello no parece tener ningún influjo evolutivo (135). No existen datos sobre las

implicaciones evolutivas de la expresión de este receptor en ningún otro tumor humano. Las diferencias encontradas entre los distintos autores pueden reflejar la heterogeneidad de las neoplasias humanas y la necesidad de evaluar separadamente cada uno de los tumores y su relación con la expresión del receptor de eritropoyetina. Por otro lado, el tamaño muestral de todos estos trabajos es inferior a 100 pacientes por lo que quizá también podría existir una falta de potencia estadística a la hora de obtener diferencias estadísticas. Sin embargo, el efecto protector demostrado en los carcinomas medulares de tiroides no es posible explicarlo a través de argumentos estadísticos, por lo que son necesarios nuevos estudios que permitan establecer un nexo biológicamente plausible entre los diferentes tumores.

No existen datos in vivo que sugieran una explicación al descenso de la supervivencia global en aquellos pacientes con carcinoma de vejiga que expresan el receptor de eritropoyetina. Sin embargo se conoce desde hace tiempo que existe expresión de este receptor en multitud de neoplasias humanas y que esta expresión se relaciona, bajo ciertas circunstancias, con efectos carcinogénicos tales como la proliferación, la angiogénesis y la invasividad. En este sentido, la primera evidencia acerca de la presencia del receptor de eritropoyetina en células tumorales fue obtenida por Todokoro y colaboradores en 1987 (136) sobre la línea celular eritroleucémica murina SKT6. No obstante, el posible efecto que se podría inferir de la presencia de este receptor estuvo sujeto a cierta controversia. Por un lado, su expresión y posterior activación por un ligando era capaz de inducir proliferación y diferenciación normal hacia colonias eritroides en líneas eritroleucémicas (137-138) y en sistemas celulares (JK-1) obtenidos de pacientes diagnosticados de

leucemias (139) lo cual era un reflejo de su función fisiológica. Por el contrario, la presencia en las líneas derivadas de pacientes, en aquellas obtenidas de forma directa de biopsias de médula ósea de pacientes diagnosticados de eritroleucemia, tales como la TF-1 (140) o directamente sobre células circulantes (141-142) generó la incertidumbre sobre su implicación en la génesis de las leucemias estudiadas. Es posible que las diferencias en la capacidad de diferenciación frente a proliferación evidenciada en distintas líneas obtenidas de pacientes diagnosticados de neoplasias estuvieran bajo el influjo que la administración de ciertos citotóxicos ejercen sobre la expresión del receptor. Por ejemplo, en líneas tales como la K562, la expresión de receptores de eritropoyetina se puede regular con el uso de fármacos citotóxicos de la familia de las antraciclinas. Así, la incubación con diferentes concentraciones de aclacinomicina genera paradójicamente un aumento en el número de receptores de eritropoyetina, lo cual va asociado a eventos de diferenciación eritroide (143-144). Por ello, los datos contradictorios en este sentido deben ser analizados con cautela. Además, en líneas celulares leucemoides con diferenciación eritroide inducidas por la transfección de raf y c-myc la activación por mecanismos autocrinos del receptor provocaba una proliferación incontrolada sin obtenerse diferenciación alguna. Este hallazgo sugería que, aunque el rendimiento fuera escaso (aproximadamente 1 de cada 10E7 células) el efecto biológico de proliferación sin diferenciación era posible. (145.). La confirmación de potencial carcinogénico de la activación del receptor de eritropoyetina se obtuvo tras inducirse la transformación maligna de una línea celular de fibroblastos como resultado de la transfección de la proteína viral gp55, la cual generaba una activación mantenida del receptor. (146-147).

El estímulo continuado del receptor de eritropoyetina es un mecanismo de proliferación neoplásica tal y como se ha evidenciado en diversos estudios. Por ejemplo, la presencia de un dominio exoplásmico o una región carboxi-terminal mutada traduce un receptor hipersensible a eritropoyetina y un retardo en el recambio e internalización del receptor respectivamente. Estas alteraciones son responsables del evento proliferativo asociado a su presencia y se han implicado en muchas de las líneas eritroleucémicas infectadas por el virus de Friend (148). Se han descrito otras alteraciones genómicas de este receptor que generaban proliferación relacionada directamente con la sobreexpresión del mismo tales como la inserción de una repetición terminal larga en la región no codificante del exón 1, aproximadamente a 45 pares de bases del primer ATG (149-150). Además, la expresión del receptor inducía el silenciamiento de p53 en un xenoimplante que desarrollaba una eritroleucemia murina (151). En cualquier caso, está demostrado que la presencia del receptor de eritropoyetina tiene una capacidad oncogénica que es crítica en la inducción de eritroleucemia humana (152).

La evidencia de receptores de eritropoyetina con capacidad proliferativa en sistemas celulares no eritroides se obtuvo sobre la línea celular de mieloma múltiple MM-S1 (153) y en otra línea con diferenciación plasmacítica (TEPC-2027) se demostró la capacidad inductora de proliferación que asocia la expresión del receptor de eritropoyetina en presencia de su ligando (154). Los primeros datos en tumores sólidos se obtuvieron en carcinoma de pulmón no microcítico (155-156). Posteriormente se ha demostrado la presencia del receptor en carcinoma de próstata (157-158), carcinoma gástrico (121), melanoma (159), carcinoma de cérvix (160), multitud

de tumores pediátricos (122) y en el schwannoma vestibular (161) entre otros. Todos los datos sobre la expresión de mRNA obtenidos desde microarrays de cDNA se pueden consultar en la página pública [www.oncomine.com](http://www.oncomine.com). Su análisis exhaustivo queda fuera de la intención de este trabajo de investigación.

El mecanismo por el que se induce la expresión del receptor de eritropoyetina también está sujeto a gran controversia. Por un lado se ha sugerido que la hipoxia es un evento crítico en la inducción tanto del receptor como de su ligando. Así, se ha demostrado su presencia en las regiones más hipóxicas de muestras de carcinoma de mama humano así como en las células endoteliales inmediatamente adyacentes a neoplasias mamarias (162-163), en regiones necróticas de carcinoma de cérvix (160) y en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (164). Es más, la regulación autocrina por eritropoyetina es capaz de inhibir el efecto pro-apoptótico de la hipoxia en estos tumores (165). Este evento hipóxico como mecanismo inductor de expresión del receptor de eritropoyetina y de su ligando concuerda con las implicaciones que en la inducción de angiogénesis se le han atribuido. (120-122). Por ejemplo, Batra y colaboradores han demostrado en diversas líneas celulares que expresaban el receptor de eritropoyetina que su incubación con eritropoyetina es capaz de aumentar la síntesis de genes antiapoptóticos tales como bcl-1, bcl-xL y mcl-1, incrementa el nivel de translocación de NF-kB al núcleo y la secreción de VEGF y PGF (122.). Por otro lado, Nakamatsu et al han demostrado un aumento en la densidad vascular en tumores hepáticos que expresaban el receptor de eritropoyetina inducidos en ratas en presencia de eritropoyetina (166) En este sentido debemos destacar que el aumento de la densidad microvascular (DMV) se





correlaciona con una mayor incidencia de metástasis y un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, entre ellos el de vejiga (123)(124). Sin embargo, otros autores no han conseguido confirmar en carcinoma de mama la potencial implicación de la hipoxia como inductor de la expresión del receptor (167) ni la densidad en la expresión del receptor en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello como marcador de hipoxia (135).

La asociación entre la expresión del receptor de eritropoyetina y la inducción de proliferación es otra de las potenciales explicaciones al mal pronóstico asociado a la presencia del mismo. La relación entre activación del receptor y proliferación se ha demostrado en distintos escenarios experimentales aun cuando existen datos contradictorios. Por ejemplo, Rossi et al evaluaron el efecto sobre la capacidad proliferativa de diversas líneas celulares derivadas de tumores sólidos y hematológicos y no evidenciaron cambio alguno incluso en presencia de altas dosis de eritropoyetina (168). Estos resultados han sido reproducidos por diversos autores (169) Por ejemplo, Wollman y colaboradores analizaron la respuesta proliferativa de la incubación con eritropoyetina sobre una línea celular de neuroblastoma humano (h-NMB) en la que se demostró mediante RT-PCR la expresión del receptor sin conseguir demostrar efecto proliferativo alguno (170). Este hecho ha sido reproducido por otros autores en otras líneas de neuroblastoma tales como SH-SY5Y y Kelly cells (171). Sin embargo en otras líneas de neuroblastoma (SK-N-MC) es capaz de unirse al receptor y modular la concentración de calcio intracelular. Este hecho, que no implica proliferación, demuestra que su unión implica, bajo ciertas condiciones, actividad del receptor en diversos sistemas de señalización intracelular de tumores sólidos (172). Por otro lado, experimentos

realizados sobre líneas celulares de carcinoma renal humano (Caki-2, 786/0) y murino (RAG) con expresión del receptor y sobre muestras obtenidas de tumores intervenidos si han demostrado eventos de proliferación dependientes de la unión del ligando (173). Además, la inhibición de la unión de eritropoyetina a su receptor mediante anticuerpos frente a la primera es capaz de inducir apoptosis masiva tanto en xenoimplantes de neoplasias ováricas y uterinas que expresaban el receptor así como en las células endoteliales responsables de la angiogénesis circundante a los mismos (174).

Se conoce que el receptor de eritropoyetina es capaz de activar diversas rutas de señalización intracelular entre las que destacan JAK/STAT, MAPK y PI3K (figuras 3 y 8). La presencia tanto de STAT5 nativo y fosforilado como de JAK-2 en forma activa en células neoplásicas tras el estímulo con eritropoyetina sugiere la implicación de este sistema en el fenotipo obtenido tras su estímulo (120). Este efecto también se ha demostrado en xenoimplantes en los que la administración de un péptido que mimetice la acción de eritropoyetina inducía la fosforilación de STAT5 y el crecimiento de la neoplasia y de las células endoteliales (175). Además, un inhibidor de Jak2 es capaz de bloquear ciertos efectos que la incubación con eritropoyetina induce en ciertas líneas celulares (176). Arcasoy y colaboradores demostraron que en líneas celulares de carcinoma de mama murino, con expresión del receptor de eritropoyetina, el bloqueo con anticuerpos o con receptores solubles de la eritropoyetina o el uso de inhibidores de Jak2 producía un retraso cercano al 45% en el crecimiento de la neoplasia (167). Recientemente, Pajonk et al han demostrado una intensa activación de NF- $\kappa$ B en células HeLa transfectadas de forma estable con el receptor de eritropoyetina así como un efecto proliferativo

muy marcado. Fue muy relevante el hecho de que no era precisa la inactivación de I $\kappa$ Ba ni el efecto fue evitable por inhibición del sistema ubiquitina- proteasoma (177). Por el contrario, existen líneas celulares con expresión estable del receptor en las que la incubación con eritropoyetina permite una modulación del sistema de NF $\kappa$ B a través de p65/p50 que potencia el efecto pro-apoptótico de ciertos fármacos citotóxicos (178). En este sentido, Shannon y colaboradores han demostrado en un modelo animal de carcinoma de pulmón de Lewis que la protección frente a la anemia que aporta el uso de darbepoetina (un derivado muy homólogo a eritropoyetina) aumenta la respuesta de este tumor a la quimioterapia (179). Por otro lado, en líneas celulares derivadas de melanoma humano con expresión del receptor, la incubación con eritropoyetina inducía la expresión de Raf, Mek, la secreción de sí misma como probable mecanismo autocrino de regulación y resistencia a dacarbacina (180). Por ello, en cada neoplasia parece que se recluta una vía diferente. En este sentido, la activación del receptor de eritropoyetina es capaz de inducir supervivencia en la línea celular de glioma U87 y en la línea de carcinoma escamoso de cérvix HT100, confiriendo resistencia a cisplatino y a la radiación. (176). Este efecto se ha sugerido también en las líneas celulares derivadas de carcinoma de ovario OVCAR3 y SKOV3 (181).

La expresión del receptor de eritropoyetina se ha relacionado con adquisición de capacidad invasiva por parte de las células neoplásicas. Datos recientes sugieren que en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello la expresión del receptor es diferente en metástasis ganglionares frente al tumor primitivo. Así, la activación del receptor y la señalización por el sistema JAK/STAT podrían jugar un papel relevante en la

adquisición de capacidad invasiva por parte de estos tumores (182-183). Esta circunstancia se ha reproducido en carcinoma de ovario humano (181).

De forma conjunta todos estos datos apoyan nuestros resultados. Además, el único ensayo clínico en el que se ha evaluado el uso de eritropoyetina en pacientes en tratamiento adyuvante ha provocado un descenso en la supervivencia. En este estudio fase III, se randomizó a pacientes intervenidos de carcinoma de cabeza y cuello a recibir, de forma conjunta con el tratamiento adyuvante de radioterapia y quimioterapia, dosis altas de eritropoyetina recombinante humana tipo beta. Los resultados finales evidenciaron una menor supervivencia global en el grupo tratado con eritropoyetina (184). A pesar de las múltiples críticas a las que se ha visto sometido el diseño del estudio (185), los datos emanados de este grupo de pacientes (en el que no existe el influjo de una enfermedad diseminada), son, de forma conjunta con las evidencias moleculares lo suficientemente inquietantes como para generar una importante polémica en relación con los potenciales efectos derivados de la activación del receptor de eritropoyetina en células tumorales no eritroides.

A pesar de estos resultados es posible que ciertos sesgos de selección inherentes a los estudios retrospectivos puedan explicar la asociación evidenciada en el análisis estadístico. Para evitar esta posibilidad se analizaron otras variables con conocidas implicaciones pronósticas en el carcinoma de vejiga con la intención de confirmar la validez interna de los datos que habíamos obtenido en relación con la expresión del receptor y su implicación en términos de supervivencia global.

Los pacientes incluidos en nuestro estudio que debutaron con hematuria macroscópica presentaron un peor pronóstico en términos de supervivencia global ( $p < 0.0001$ ) (Figura 12). La influencia de la hematuria macroscópica al diagnóstico está sujeta a cierto grado de controversia. Por ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en el Servicio de Urología del Hospital de Valdecilla de Santander sobre 243 pacientes, la presencia de hematuria al diagnóstico imprimió un mejor pronóstico. Sin embargo, en este estudio más del 50% de los pacientes tenía un carcinoma superficial, frente al 14.7% de nuestro trabajo. Este hecho podría explicar las diferencias observadas entre nuestros resultados (186). Por el contrario, Thraser y colaboradores demostraron que la presencia de síntomas irritativos, entre los que se incluyó la hematuria, se asociaban a un peor pronóstico en un grupo de 531 pacientes intervenidos mediante cistectomía radical ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, estos autores incluyeron en el mismo estudio a pacientes diagnosticados de carcinoma de vejiga y de carcinoma de próstata por lo que sus resultados no pueden ser extrapolados de forma global (187). Estos resultados son similares a los observados por Liponnen y colaboradores ( $p = 0.033$ ) aun cuando la hematuria se incluye dentro de una miríada de síntomas al diagnóstico que obscurecen la posible asociación, por lo que nuevamente no es posible la extrapolación (188). Hay que destacar el hecho de que la presencia de hematuria macroscópicamente evidente podría reducir el tiempo hasta la primera consulta, lo cual se ha sugerido como factor pronóstico independiente (189). Por otro lado, la hematuria macroscópica se ha asociado a estadios más avanzados, por lo que es posible que su influjo sobre la supervivencia no sea más que el reflejo del generado por una neoplasia más invasiva. Esta última

explicación no podría ser aplicada en nuestro trabajo ya que no existió correlación entre la hematuria y el estadio tumoral ( $p=0.1402$ )(Tabla 5). Por último, para evaluar la influencia pronóstica de la expresión del receptor de eritropoyetina sobre aquellos pacientes que presentaron hematuria se realizó un análisis de regresión de Cox el cual evidenció que la combinación de hematuria con expresión del receptor en un mismo paciente genera un riesgo relativo de muerte significativamente elevado frente a otras combinaciones de estas dos características (Exp.beta 4.243 IC 95% 1.908 - 9.435). Esta combinación, no analizada en ninguno de los estudios anteriormente descrito, así como la inclusión de pacientes en múltiples estadios podrían ser la causas fundamentales de las diferencias que nuestros resultados presentan frente a los otros trabajos citados. Así pues, en nuestro grupo de pacientes la presencia de hematuria al diagnóstico es factor de mal pronóstico, sobre todo si la neoplasia presenta expresión del receptor de eritropoyetina asociada. (Tabla 9).

La presencia de obstrucción uretral al diagnóstico se asoció con una menor supervivencia en nuestros pacientes ( $p<0.0001$ )(Figura 13). Este efecto pronóstico ha sido corroborado por otros autores. Matos y colaboradores en un estudio sobre 105 pacientes sometidos a cistectomía por carcinoma de vejiga no superficial demostraron que la presencia de obstrucción uretral al diagnóstico imprimía un peor pronóstico sobre los pacientes, probablemente porque podía sugerir diseminación local con mayor seguridad que el estadio T (190). En este sentido se ha sugerido que es capaz de predecir invasión

**Tabla 9.- Regresión de Cox EPOR vs Hematuria**

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Step 1 EPOR_R	1,487	0,404	13,554	1	0,000	4,425	2,005	9,767
Step 2 EPOR_R	1,445	0,408	12,560	1	0,000	4,243	1,908	9,435
HEMATURI	1,231	0,353	12,167	1	0,000	3,425	1,715	6,841

muscular en más de un 90% de los casos (191). Por otro lado, Thraser y colaboradores demostraron que la presencia de obstrucción al diagnóstico también era un signo de mal pronóstico (187). Sin embargo, la mayoría de los autores han relacionado este síntoma con un estadio tumoral más avanzado por lo que sería un reflejo de una T mayor. En nuestros pacientes no se ha demostrado relación alguna entre el estadio y la presencia de obstrucción uretral al diagnóstico ( $p=0.7131$ ) (Tabla 5). Además, tampoco hemos evidenciado relación entre esta variable y la expresión del receptor de eritropoyetina ( $p=0.0882$ ) (Tabla 7) a pesar de que existe una importante tendencia hacia la significación. Aun así, el análisis de correlación de Cox demuestra que la presencia de obstrucción uretral al diagnóstica en pacientes con expresión del receptor de eritropoyetina es un dato de pronóstico infausto (Exp beta 3.514 IC 1.560- 7918). (Tabla 10). Probablemente, la presencia de obstrucción uretral podría influir sobre la supervivencia de nuestros pacientes debido a la génesis de complicaciones post-quirúrgicas de un enfermo con insuficiencia renal y un tumor de localización crítica. Sin embargo, estas variables no se han recogido por lo que no podemos más que especular sobre esta posibilidad.

En nuestro grupo de pacientes la presencia de crecimiento papilar se asoció a una peor supervivencia ( $p<0.0001$ )(Figura 14). Estos datos contrastan claramente con la mayoría de los trabajos publicados hasta la actualidad (25). Pero es muy importante tener en cuenta que la mayoría de los artículos en los que se analiza el crecimiento papilar como factor de buen pronóstico se incluyen tumores con grado de diferenciación 1 (192) mientras que todos los pacientes que incluimos en nuestro trabajo tenían un grado de



**Tabla 10.- Regresión de Cox EPOR vs Obstrucción uretral**

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
								Lower	Upper
Step 1	OBST_URT	1,759	0,359	24,061	1	0,000	5,805	2,875	11,723
Step 2	EPOR_R	1,257	0,414	9,198	1	0,002	3,514	1,560	7,918
	OBST_URT	1,494	0,368	16,510	1	0,000	4,454	2,167	9,156

diferenciación 3 por lo que es posible que el influjo pronóstico del crecimiento papilar estuviera modificado por el grado de diferenciación. Además, se asoció de forma significativa la expresión del receptor de eritropoyetina con esta modalidad de crecimiento ( $p=0.0158$ ) (Tabla 7) y en el análisis de regresión de Cox se demostró que la asociación entre crecimiento papilar y expresión del receptor generaba un alto riesgo de muerte (exponencial de beta 3.055 IC 1.355 - 6.887). (Tabla 11). Estos datos en combinación con la implicación molecular en promoción de angiogénesis de la expresión del receptor de eritropoyetina pueden explicar el influjo pronóstico evidenciado en nuestros resultados. Sin embargo, no se ha recogido la presencia de otros tipos de crecimiento (por ejemplo el crecimiento sólido) por lo que tenemos cierto grado de limitación en la explicación global de esta asociación. Finalmente, tampoco existió asociación entre el crecimiento papilar y el estadio tumoral, por lo que esta última variable no es capaz tampoco de explicar la asociación ( $p=0.4067$ )(Tabla 5).

Aquellos pacientes que presentaron carcinoma in situ al diagnóstico obtuvieron una menor supervivencia global ( $p<0.0001$ )(Figura 15). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios en los que se analizaba la presencia de carcinoma in situ en relación con la supervivencia de los pacientes. En este punto debemos tener en cuenta que esta asociación se ha sugerido como factor pronóstico en pacientes diagnosticados de carcinomas no invasivos (193-194) mientras que los datos pronósticos en pacientes con enfermedad músculo-invasiva son muy escasos pero con probable influjo en términos de menos supervivencia (25). En nuestros pacientes la presencia de carcinoma in situ en las vejigas intervenidas

**Tabla 11.- Regresión de Cox EPOR vs Estructura papilar**

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
								Lower	Upper
Step 1	PAPILAR	2,321	0,388	35,793	1	0,000	10,188	4,763	21,795
Step 2	EPOR_R	1,117	0,415	7,247	1	0,007	3,055	1,355	6,887
	PAPILAR	2,129	0,400	28,298	1	0,000	8,402	3,835	18,407

se asoció a mayor estadio tumoral ( $p=0.0267$ )(Tabla 5). Sin embargo, no se recogió dentro de nuestras variables si los carcinomas in situ eran primarios o secundarios por lo que la diferencia pronóstica evidenciada por ciertos autores (2). La presencia de carcinoma in situ se relacionó de forma significativa ( $p=0.004$ ) con la expresión del receptor de eritropoyetina (Tabla 7) y su asociación en el mismo paciente se asociaba a un peor pronóstico (exp beta 2.313 IC 1.01- 5.3)(Tabla 12). Los cambios moleculares asociados al carcinoma in situ de vejiga sugieren una pérdida del control efectivo de la regulación del paso de G1/S por alteraciones en pRb e INK4. Estas alteraciones en combinación con la posible activación autocrina del receptor de eritropoyetina promoverían proliferación no controlada lo cual, en el contexto de una célula neoplásica, explicaría parcialmente el peor pronóstico de ciertos pacientes. En este sentido, la determinación conjunta de estos parámetros podría aportar la posibilidad de mejorar la estratificación pronóstica de este contexto clínico.

La presencia de displasia asociada a la mucosa circundante a la neoplasia vesical reflejó una peor supervivencia ( $p<0.0001$ )(Figura 16). Heney y colaboradores demostraron en 249 pacientes que la presencia de displasia asociada a los tumores superficiales se relacionaba con intervalos de supervivencia menores (5, 195). Este efecto pronóstico ha sido puesto en tela de juicio en un trabajo posterior con un mayor número de pacientes y con una mayor cantidad de variables analizadas (193, 196) mientras que otros autores lo han sugerido como factor pronóstico en pacientes con tumores Ta, perdiendo esta capacidad de influencia en estadios más avanzados (197). La presencia

**Tabla 12.- Regresión de Cox EPOR vs CIS asociado**

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
								Lower	Upper
Step 1	ASOC_CIS	2,458	0,432	32,411	1	0,000	11,685	5,013	27,238
Step 2	EPOR_R	0,839	0,423	3,930	1	0,047	2,313	1,010	5,300
	ASOC_CIS	2,210	0,449	24,244	1	0,000	9,118	3,783	21,977

de displasia se asocia a una activación aberrante de bcl-2 seguida posteriormente de la expresión de variantes no funcionales de p53 (198) por lo que no es de extrañar que la asociación entre la presencia de esta alteración morfológica y la expresión del receptor de eritropoyetina empeore el pronóstico de los pacientes portadores de la combinación (exponencial beta 3.341 IC 95% 1.456- 7.668)(Tabla 13). En nuestros pacientes no se encontró asociación entre la presencia de displasia en la mucosa circundante a la neoplasia y el estadio tumoral ( $p= 0.4607$ ) (Tabla 5) por lo que no es probable que el estadio tumoral esté sesgando la asociación pronóstica.

Otra característica que en ciertos estudios se ha asociado a menor supervivencia es la presencia de nidos de Von Brunn (5). En nuestros pacientes también se confirmó esta asociación ( $p=0.0117$ ) (Figura 17) sin que existieran diferencias significativas dentro de cada uno de los estadios ( $p= 0.3693$ )(Tabla 5). Por otro lado, no existió asociación entre la presencia de nidos de von Brunn y la expresión del receptor de eritropoyetina ( $p=0.6182$ )(Tabla 7). Debido a que el grupo de tumores en los que se detectó la presencia de estas estructuras fue muy baja ( $n=4$ ) , es posible que el pequeño número de eventos esté limitando la posibilidad de detectar diferencias entre grupos. Sin embargo, debemos recordar que la observación de nidos de Von Brunn es reflejo de cambios proliferativos en la mucosa de forma que ésta forma cordones epiteliales y repliegues que pueden quedar debajo del epitelio superficial. Al fin y al cabo, no es más que una expresión de una mucosa que prolifera (5) por lo que es razonable la asociación con un peor pronóstico. Es más, conceptualmente podría considerarse una mucosa displásica.

**Tabla 13.- Regresión de Cox EPOR vs Displasia asociada**

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
								Lower	Upper
Step 1	ASOC_DIS	1,353	0,340	15,811	1	0,000	3,870	1,986	7,541
Step 2	EPOR_R	1,206	0,424	8,098	1	0,004	3,341	1,456	7,668
	ASOC_DIS	0,968	0,356	7,394	1	0,007	2,634	1,311	5,294

La citología positiva para malignidad en el estudio de extensión de los pacientes intervenidos se asoció a una menor supervivencia ( $p=0.0001$ )(Figura 18). Esta asociación es similar a la encontrada por otros autores ya que indican un potencial agresivo del tumor (25). Entre otros, Chow y colaboradores evaluaron en 65 pacientes el influjo pronóstico de la citología urinaria previa a la intervención quirúrgica definitiva en tumores vesicales demostrando un peor pronóstico en aquellos en los que fuera positiva (199) mientras que Tut et al confirmaron esta asociación en tumores superficiales (200). Otros investigadores han sugerido que la presencia de células malignas en la citología urinaria se asocia a un mayor estadio tumoral (201) circunstancia ésta que no hemos observado en nuestro grupo de pacientes ( $p=0.0846$ )(Tabla 5). Sin embargo, en nuestros enfermos existe una asociación entre la citología urinaria con semiología de malignidad y la expresión del receptor de eritropoyetina ( $p=0.0372$ )(Tabla 7). Además, la asociación de ambas características empeora el pronóstico en términos de supervivencia (exponencial de beta 3.947 IC 95% 1.776- 8.773)(Tabla 14). Desde nuestro punto de vista, es congruente esta asociación, ya que ambas variables podrían ser reflejo de una mayor agresividad tumoral.

En un análisis multivariante que incluía estadio (categoría T), grado tumoral, grado papilar, seis factores nucleares e índice mitótico corregido por el volumen celular, se ha dado una gran significación para un pronóstico favorable a la densa infiltración linfocitaria intratumoral (202), a pesar de que en otros estudios este fenómeno ha sido indicativo de mal pronóstico. Estas controversias han aumentado debido a artículos en los que se han analizado las diferentes poblaciones linfocitarias presentes en los tumores vesicales, que



no han conseguido demostrar diferencia alguna en relación con las poblaciones linfocitarias de la mucosa urotelial normal (203) a pesar de que podrían encontrarse activados en presencia de células neoplásicas (204.). Sin embargo y a pesar de que se ha sugerido que la infiltración linfocitaria podría ser reflejo de una respuesta inmune frente al tumor (205) en tumores avanzados no se ha objetivado una mejor evolución clínica (202). En nuestro grupo de pacientes, la infiltración linfocitaria no se asoció a una menor supervivencia ( $p=0.8299$ ) (Figura 19) ni a la expresión del receptor de eritropoyetina ( $p=0.125$ ) (Tabla 7). Finalmente, el estadio tumoral, codificado como superficial (T1) frente a invasivo (T2, T3 y T4) se relacionó claramente con la probabilidad de morir a causa de la enfermedad ( $p=0.0321$ ), tal y como era de esperar. Son muy abundantes los datos previos que avalan este hallazgo (25, 206-207). Sin embargo no hemos encontrado correlación entre la expresión del receptor de eritropoyetina y el estadio, tanto agrupado por superficial frente a no superficial ( $p=0.2220$ ) como por categorías independientes ( $p=0.122$ ) (Tabla 5). A pesar de esto, sí se encuentran diferencias significativas ( $p=0.0212$ ) cuando se analiza la expresión del receptor de eritropoyetina en tumores capaces de alcanzar las capas profundas de la muscular propia o en mayor profundidad (T3-T4) frente a aquellos que no infiltran o lo hacen exclusivamente en la región más superficial de ésta (T1-T2). No se han descrito en la actualidad cambios moleculares que permitan explicar la diferente invasividad de los tumores vesicales. Si tenemos en cuenta los datos previamente expuestos que apoyan

**Tabla 14.- Regresión de Cox EPOR vs positividad de Citología**

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
								Lower	Upper
Step 1	EPOR_R	1,487	0,404	13,554	1	0,000	4,425	2,005	9,767
Step 2	EPOR_R	1,373	0,408	11,351	1	0,001	3,947	1,776	8,773
	CITOLOG	1,196	0,370	10,436	1	0,001	3,308	1,601	6,835

el aumento de movilidad de las células neoplásicas que expresan el receptor de eritropoyetina y las diferencias en la expresión del mismo entre tumores primitivos y sus metástasis ganglionares, inmediatamente surge la hipótesis de la expresión del receptor de eritropoyetina como mecanismo de infiltración de capas más profundas. Evidentemente nuestro trabajo no está diseñado para responder a esta hipótesis pero futuros estudios podrían analizar esta posibilidad.

En nuestro grupo de pacientes hemos evidenciado que existen variables diferentes a la expresión del receptor de eritropoyetina que imprimen peor pronóstico. Además, en muchos casos la presencia de una variable de mal pronóstico se asocia también a la presencia de nuestra variable principal. Así es posible que el peso de nuestra variable pudiera estar influenciado por el peso de las variables que hemos definido como secundarias y que imprimen mal pronóstico, sesgando de esta manera nuestras conclusiones. Para analizar esta posibilidad hemos realizado una regresión de Cox por pasos, incluyendo todas las variables que se asociaban significativamente a una menor supervivencia (presencia de hematuria al diagnóstico, obstrucción uretral al diagnóstico, crecimiento papilar, asociación de carcinoma in situ, asociación de displasia en la mucosa circundante, positividad en la citología urinaria prequirúrgica y expresión del receptor de eritropoyetina). En este análisis las tres variables que tienen mayor peso estadístico son la presencia de hematuria al diagnóstico (exponencial de beta 2.409; IC 95% 1.203- 4.824), el crecimiento papilar ( exponencial de beta 4.723; IC 95% 2.064- 10.803) y la presencia de carcinoma in situ asociado (exponencial de beta 5.988; IC 95% 2.403- 14.923). Este resultado supone que la expresión del receptor de eritropoyetina no es la

variable con mayor peso en la evolución de nuestro grupo de pacientes. Sin embargo, su presencia imprime un peor pronóstico a aquellos pacientes con variables que predicen peor supervivencia. Así, la asociación entre la expresión del receptor de eritropoyetina y la presencia de carcinoma in situ genera un exponencial de beta de 9.118 (IC 95% 3.783- 21.977) frente al riesgo estimado de la presencia no modulada de carcinoma in situ (exponencial de beta 5.988; IC 95% 2.403- 14.923). Este hecho se repite tanto con el crecimiento papilar (exponencial de beta 8.402; IC 95% 3.835- 18.407) como con la presencia de hematuria al diagnóstico (exponencial de beta 3.425; IC 95% 1.715- 6.841) así como con el resto de las variables que imprimen un rasgo de peor supervivencia.

Nuestro trabajo presenta varias limitaciones. Por un lado, la determinación de la expresión del receptor de eritropoyetina y su localización mediante inmunohistoquímica en las células tumorales no implica la funcionalidad del mismo. Este hecho podría ser resuelto en futuros trabajos de investigación con la determinación de la expresión de las proteínas asociadas a la activación del mismo, tales como STAT5 y JAK2 entre otras. Incluso, su presencia no tiene porqué aportar responsabilidad directa en términos proliferativos por lo que también serían necesarios estudios de funcionalidad de la vía in vivo. Esto último está claramente limitado por el desarrollo tecnológico actual, pero en un futuro será viable. Las tecnologías de alto rendimiento en evaluación genómica y proteómica de las neoplasias nos han aportado nuevas evidencias que limitan el peso que el análisis de variables biológicas aisladas tienen sobre la evolución clínica de los pacientes por lo que es posible que la expresión del receptor de eritropoyetina no sea más que un reflejo de otras

alteraciones más profundas y relevantes pendientes de describir. Es más, la mayoría de las variables únicas no son capaces de explicar todo el comportamiento biológico de una entidad tremendamente heterogénea como es una neoplasia humana, por lo que nuestros resultados deben ser tomados con la cautela inherente a la observaciones que se saben parciales. Por otro lado, hemos descrito en el análisis de cada variable secundaria ciertas limitaciones en su recolección. Por ejemplo, la imposibilidad de recoger la diferencia entre carcinoma in situ primario frente a secundario, o la ausencia de datos sobre tratamientos posteriores que pudieran haber modificado la supervivencia de los pacientes pueden limitar nuestras observaciones. Sin embargo, hasta los últimos años no han existido tratamientos para la enfermedad diseminada que pudieran ser administrados a pacientes con situaciones clínicas de fragilidad por lo que no es probable que esta posibilidad haya ejercido un influjo relevante. La selección de pacientes con grados de diferenciación 3 podría ser otro factor limitante. Sin embargo, se conoce que el grado de diferenciación tiene un peso enorme en los estadios superficiales, mientras que en los avanzados es poco probable que haya sesgado la evolución clínica de los pacientes. Por último, es obvio que los datos obtenidos desde la regresión de Cox por pasos y un diseño retrospectivo pueden generar cierta duda sobre las implicaciones pronósticas que asocia la expresión del receptor de eritropoyetina. Sin embargo, nuevos estudios prospectivos, con mayor tamaño muestral y quizá, mayor cantidad de parámetros biológicos puedan aportar luz a la posible asociación pronóstica que la expresión del receptor de eritropoyetina tiene en los pacientes intervenidos por carcinoma de células transicionales de vejiga.

En conclusión, hemos detectado mediante inmunohistoquímica la expresión del receptor de eritropoyetina en carcinomas de células transicionales de vejiga. Este hecho no había sido evidenciado hasta ahora y corrobora los datos obtenidos en análisis previos en los que se ha determinado la expresión de su mRNA. Además, la expresión del receptor de eritropoyetina en muestras tumorales de pacientes intervenidos mediante cistectomía radical por carcinoma de células transicionales de vejiga es un factor de mal pronóstico en términos de supervivencia global. La combinación de esta variable con otras mejora la capacidad de predicción de menor supervivencia en un subgrupo de pacientes con especial mal pronóstico. Nuestros datos apoyan su evaluación en estudios futuros para su integración en un nuevo sistema de estratificación de riesgo de muerte en pacientes con carcinoma de vejiga con claras aplicaciones asistenciales. Finalmente, nuestros resultados sugieren la posibilidad del desarrollo de antagonistas del receptor de eritropoyetina como una terapia complementaria a los tratamientos anti-neoplásicos actuales.



El carcinoma de vejiga es responsable de más de 140.000 muertes anuales y los tratamientos locales fundamentados en la cistectomía radical son, bajo ciertas circunstancias, la única posibilidad de curación. Sin embargo muchos pacientes desarrollarán enfermedad a distancia y morirán como consecuencia de ésta. Así se han establecido multitud de factores pronósticos para delimitar el riesgo de muerte de cada paciente. Estos factores incluyen características clínicas del paciente (edad, sexo, presencia de obstrucción uretral al diagnóstico, citología positiva al diagnóstico y presencia de hematuria al diagnóstico entre otros) y características patológicas de la neoplasia (estadio tumoral T, estado ganglionar, grado de diferenciación, presencia de estructuras papilares, presencia de carcinoma in situ asociado, presencia de displasia en la mucosa circundante a la neoplasia, presencia de nidos de Von Brunn y presencia de infiltración linfocitaria entre otros). Además, en los últimos años se han incluido una serie de parámetros moleculares propios del tumor entre los que destacan la presencia de mutaciones de p53, alteraciones en la regulación del ciclo celular y de la capacidad de apoptosis. Sin embargo, a pesar de los ingentes datos moleculares, clínicos y patológicos, hoy día no es posible la determinación absoluta del riesgo de recaída y muerte por carcinoma de células transicionales de vejiga por lo que son necesarios nuevos estudios que permitan identificar nuevos parámetros a incluir en las clasificaciones de riesgo. Recientemente se ha demostrado que existe expresión del receptor de eritropoyetina humana en una amplia variedad de tumores humanos. Además, se ha sugerido desde modelos animales realizados con tumores que sobre-expresaban el receptor de eritropoyetina, que la presencia de esta proteína podría implicar aumento en la proliferación de las células tumorales e inducción



de angiogénesis. En relación con el carcinoma de vejiga sólo existen hasta el momento de la redacción de este trabajo de investigación dos artículos en los que se ha evaluado la presencia de mRNA de esta proteína. En estos dos trabajos se determinó la existencia de los citados transcritos en neoplasias vesicales dentro de un análisis de transcriptoma completo con fines descriptivos sin incluir la evolución como parámetro de comparación. Además, es conocida la regulación post-traducciona de la expresión de este receptor por lo que su determinación proteica y su localización subcelular es crítica para poder inferir su implicación biológica en proliferación tumoral. Por ello el objetivo fundamental del presente trabajo fue determinar la presencia del receptor de eritropoyetina humano en muestras tisulares de carcinoma de vejiga obtenidas tras cistectomías radicales y establecer su posible relación con la supervivencia global en los pacientes intervenidos.

Por ello, mediante inmunohistoquímica determinamos la presencia del dominio extracelular del receptor de eritropoyetina en 75 pacientes sometidos a cistectomía radical por el diagnóstico de un carcinoma de vejiga. Observamos expresión del mismo en el 53.3% de todos los pacientes y una clara relación con una menor supervivencia con un seguimiento de 24 meses. Este hallazgo es compatible con los datos moleculares que implican al receptor de eritropoyetina en un bucle autocrino de proliferación, supervivencia en entornos hipóxicos y como inductor de angiogénesis tumoral. Además la congruencia de los datos obtenidos se incrementa con las variables secundarias que se han analizado, aportando coherencia interna a los resultados obtenidos. Así, la expresión del receptor de eritropoyetina aumenta la intensidad pronóstica de variables tales como la hematuria en el momento del diagnóstico, la presencia

de citología con semiología de malignidad en el estudio pre-quirúrgico, el crecimiento papilar, la obstrucción uretral como sintomatología de debut y la asociación de carcinoma in situ o de displasia en la mucosa circundante al tumor principal. Además, hemos observado como se incrementa la expresión del receptor en tumores con diferente invasividad, alcanzando significación estadística en el momento en que la neoplasia alcanza las regiones más profundas de la capa muscular propia de la vejiga. Por ello, podemos concluir que la expresión del receptor de eritropoyetina es un nuevo factor pronóstico a tener en cuenta en aquellos pacientes con neoplasias vesicales con grado de diferenciación 3 sometidos a cistectomía radical. Sin embargo, se precisan nuevos estudios prospectivos que permitan la confirmación de este hallazgo así como el análisis de la potencial relevancia proliferativa que tiene la presencia de dicho receptor.



- 1.- Hemos detectado mediante inmunohistoquímica sobre muestras tisulares de carcinomas de células transicionales de vejiga con grado 3 de diferenciación la expresión de la región extracelular del receptor de eritropoyetina en el 53.3% de los pacientes.
- 2.- La presencia del citado dominio del receptor de eritropoyetina se asocia con una menor supervivencia en el grupo de pacientes analizado ( $p < 0.0001$ ) por lo que es un factor de mal pronóstico en este escenario clínico.
- 3.- La expresión del receptor de eritropoyetina aumenta las implicaciones en términos de mal pronóstico de variables tales como la presencia de hematuria al diagnóstico (exponencial de beta 4.234), obstrucción uretral al diagnóstico (exponencial de beta 3.514), crecimiento formando estructuras papilares (exponencial de beta 3.055), presencia de carcinoma in situ (exponencial de beta 2.313), presencia de displasia en la mucosa circundante (exponencial de beta 3.341) y la citología positiva en el estudio de extensión pre-quirúrgico (exponencial de beta 3.947).
- 4.- Existen diferencias en la expresión del receptor de eritropoyetina en función de la profundidad alcanzada por el tumor en las capas de la vejiga (categoría T) alcanzando la significación estadística en el momento en que la neoplasia alcanza la región más profunda de la muscular propia ( $p = 0.0212$ ).
- 5.- No existe relación entre la expresión del receptor de eritropoyetina y variables tales como el sexo de los pacientes, la observación de nidos de Von Brunn o la infiltración linfocitaria del tumor.
- 6.- En nuestro grupo de pacientes, las tres variables con mayor peso pronóstico fueron la presencia de hematuria al diagnóstico, el crecimiento papilar y la presencia de carcinoma in situ asociado. En todas ellas, la asociación con la

expresión del receptor de eritropoyetina aumento la carga en términos de mal pronóstico pronóstica de cada una.

7.- Es necesario explorar en poblaciones con mayor número de pacientes las implicaciones que la presencia de este receptor tiene en términos proliferativos en los carcinomas de células transicionales de vejiga así como analizar su inhibición como potencial mecanismo anti-neoplásico.



1. Martinez-Piñeiro JA, Martinez-Piñeiro L. (1993) Tumores vesicales en: Tratado de Urología. Jimenez Cruz JF, Rioja Sanz JR. Prous Editores. Barcelona. España. Tomo II, 65: 1151-1201.
2. Blanco E, Bocardo G y Mohamed Z (2003) Etiología, historia natural y clínica de los tumores vesicales malignos. En: Tratado de Oncología Urológica. Resel L y Moreno J. Sanidad y Ediciones S.L. Tomo I, cap 37: 495-504.
3. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. (2002) Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. Cancer Pract. Nov-Dec;10(6):311-22.
4. Ahmedin Jemal, Taylor Murray, Elizabeth Ward, Alicia Samuels, Ram C. Tiwari, Asma Ghafoor, Eric J. Feuer, and Michael J. (2005) Thun Cancer Statistics, 2005. CA Cancer J Clin, Jan; 55: 10 - 30.
5. Ordoñez A, Espinosa J, Gomez Navarro J (1994) Factores pronósticos en el carcinoma de vejiga. En: Factores pronósticos en Oncología. Eds. M. González Barón et al. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 11: 163-177.
6. Sengupta N, Siddiqui E, Mumtaz FH. (2004) Cancers of the bladder. J R Soc Health. Sep;124(5):228-9.
7. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L et al. (2000) SEER Cancer Statistics Review 1973- 1997. Bethesda, Md: National Cancer Institute.
8. Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F. (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. World J. Urol. 21: 392-401.

9. van den Brandt PA, et al (1990) A large-scale prospective cohort study on diet and cancer in Netherlands. *J. Clin Epidemiol* 43:285-295.
10. Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2001) Consumption of vegetables and fruits and urothelial cancer incidence: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1121-1128.
11. Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2001) Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotenoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 85:977-983.
12. Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2001) Are coffee, tea, and total fluid consumption associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. *Cancer Causes Control* 12: 231-238.
13. Zeegers MP, Volovics A, Dorant E, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2001) Alcohol consumption and bladder cancer risk: Results from the Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* 153: 38-41.
14. Zeegers MP, Goldbohm RA, Bode P, van den Brandt PA (2002) Prediagnostic toenail selenium and risk of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1292-1297.
15. Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2002) A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 13: 83-90.
16. Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, Kamat AM, Siefker-Radtke AO, Tuziak T, Sabichi AL, Grossman HB,



- Benedict WF, Czerniak B. (2004) Focus on bladder cancer. *Cancer Cell*. Aug;6(2):111-116.
17. Johansson SL, Cohen SM (1997) Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 13: 291-298.
  18. Vieneis P, Simonato I (1991) Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach. *Arch Environ Health* 46: 6-15.
  19. Michaud DS, Wright ME, Cantor KP, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. (2004) Arsenic concentrations in prediagnostic toenails and the risk of bladder cancer in a cohort study of male smokers. *Am J Epidemiol*. Nov 1;160(9):853-859.
  20. Markovic N, Ignjatovic I, Cukuranovic R, Petrovic B, Kocic B, Stefanovic V. (2005) Decreasing incidence of urothelial cancer in a Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969 to 1998. *Pathol Biol (Paris)*. Feb;53(1):26-29.
  21. Hilmy M, Bartlett JM, Underwood MA, McMillan DC. (2005) The relationship between the systemic inflammatory response and survival in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer*. Feb 28;92(4):625-627.
  22. Shirai T. (1993) Etiology of bladder cancer. *Semin Urol*. Aug;11(3):113-126.
  23. Zebic N, Weinknecht S, Kroepfl D. (2005) Radical cystectomy in patients aged  $\geq 75$  years: an updated review of patients treated with curative and palliative intent. *BJU Int*. Jun;95(9):1211-1214.

24. Pelucchi C, La Vecchia C, Negri E, Dal Maso L, Franceschi S (2002) Smoking and other risk factors for bladder cancer in women. *Prev Med* 35: 114-120.
25. Codes M, Albero A y Mateos AM. Cáncer de Vejiga. En: *Oncología Clínica*. Eds. Manuel González Barón et al. 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 1998; (2): 375- 384.
26. Tsukamoto T, Kitamura H, Takahashi A, Masumori N (2004) Treatment of invasive bladder cancer: Lessons from the past and perspective for the future. *Jpn J Clin Oncol* 34(6): 295-306.
27. Borden LS Jr, Clark PE, Hall MC. (2005) Bladder cancer. *Curr Opin Oncol*. May;17(3):275-80.
28. de Reijke TM, Kurth KH, Sylvester RJ, Hall RR, Brausi M, van de Beek K, Landsoght KE, Carpentier P; (2005) European Organization for the Research and Treatment of Cancer-Genito-Urinary Group. Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer--Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). *J Urol*. Feb;173(2):405-409.
29. Nseyo UO. (1997) Immunotherapy of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 13:342.
30. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL (2002) Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol*. 168: 1964-1970.

31. Oosterlinck W, Kurth KH, Schroder F, et al. (1993). A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 149: 749 – 752.
32. Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, et al. (1996) A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 156: 1934 – 1940.
33. Paroni R, Salonia A, Lev A, et al. (2001) Effect of local hyperthermia of the bladder on mitomycin C pharmacokinetics during intravesical chemotherapy for the treatment of superficial transitional cell carcinoma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52: 273-278.
34. van der Heijden AG, Witjes JA (2003) Future strategies in the diagnosis, staging and treatment of bladder cancer. *Curr Op in Urology* 13(5): 389-395.
35. Bouffieux C, Denis L, Oosterlinck W, et al. (1992) Adjuvant chemotherapy of recurrent superficial transitional cell carcinoma: results of an European Organisation for Research on Treatment of Cancer randomized trial comparing intravesical instillations of thiotepa, doxorubicin, and cisplatin. *J Urol* 148: 297.

36. Huland H, Kloppel G, Feddersen I, Otto U, Brachmann W, Hubmann H, et al. (1990) Comparison of different schedules of cytostatic intravesical instillations in patients with superficial bladder carcinoma: final evaluation of a prospective multicenter study with 419 patients. *J Urol* 144: 68- 71.
37. Buffioux C, Kurth KH, Bono A, et al. (1995) Intravesical adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: results of two European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trials with mitomycin C and doxorubicin comparing early versus delayed instillations and short term versus long term treatment. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group. *J Urol* 153: 934 – 941.
38. Zinke H, Benson RC, Jr, Hilton JF, et al. (1985) Intravesical thiotepa and mitomycin C treatment immediately after transurethral resection and later for superficial (stages Ta and Tis) bladder cancer: a prospective, randomized, stratified study with crossover design. *J Urol* 134: 1110.
39. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, et al. (1996) The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J Urol* 155: 1233-1238.
40. Ali-el-Dein B, Nabeeh A, el-Baz M, Shamaa S, Ashamallah A. (1997) Single-dose versus multiple instillations of epirubicin as prophylaxis for recurrence after transurethral resection of pTa and pT1 transitional-cell bladder tumours: a prospective, randomized controlled study. *Br J Urol* 79: 731-735.

41. Flamm J. (1990) Long-term versus short-term doxorubicin hydrochloride instillation after transurethral resection of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 17:119 – 124.
42. Okamura K, Kinukawa T, Tsumura Y, Otani T, Itoh H, Kobayashi H, et al. (1998) A randomized study of short-versus long-term intravesical epirubicin instillation for superficial bladder cancer. Nagoya University Urological Oncology Group. *Eur Urol* 33: 285-288.
43. Lamm DL, Riggs DR, Traynelis CL, et al. (1995) Apparent failure of current intravesical chemotherapy prophylaxis to influence the long-term course of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 153:1444 –1450.
44. Newling DW, Hetherington J, Sundaram SK, et al. (2001) The use of valrubicin for the chemoresection of superficial bladder cancer – a marker lesion study. *Eur Urol* 39: 643-647.
45. Okamura K, Ono Y, Kinukawa T, et al. (2002) Randomized study of single early instillation of (2''R)-4'-O-terahydropyranil-doxorubicin for a single superficial bladder carcinoma. *Cancer* 94:2363-2368.
46. Dalbagni G, Russo P, Sheinfeld J et al (2002) Phase I trial of intravesical gemcitabine in bacillus Calmette-Guérin-refractory transitional-cell carcinoma of the bladder. *J. Clin. Oncol.* 20: 3193-3198.
47. Nilsson S, Ragnhamar P, Gimelius B, Nygren P. ( 2001) A systematic overview of chemotherapy effects in urothelial bladder cancer. *Acta Oncol* 40:371-390.

48. Vallancien G, Abou El Fettouh, Cathelineau X, et al (2002) Cystectomy with prostate sparing for bladder cancer in 100 patients: 10-year experience. *J. Urol.* 168: 2413-2417.
49. Gschwend JE, Dahm P, Fair WR (2002) Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cysectomy. *Eur Urol* 41: 440-448.
50. Frank I, Cheville JC, Blute ML, et al. (2003) Transitional cell carcinoma of the urinary bladder with regional lymph node involvement treated by cystectomy: clinicopathologic features associates with outcome. *Cancer* 97: 2425-2431.
51. Soloway MS, Soffer M, Vaidya, A. (2002) Contemporary management of stage T1 transitional cell arcinoma of the bladder *J Urol* 167: 1573-83.
52. van der Meijden A, Sylvester R, Collete L, Bono A, Kate FT. (2000) The role and impact of pathology review on stage and grade assesment of stages Ta and T1 bladder tumors: a combined analysis of 5 European Organization for Research and Treatment of Cancer Trials. *J Urol* 164: 1533-1537.
53. Shvarts O, Han KR, Seltzer M, et al. (2002) Positron emission tomograph Chahal R, Sundaram SK, Iddenden R, et al (2003) A study of the morbidity, mortality and long-term survival following radical cystectomy and radical radiotherapy in the treatment of invasive bladder cancer in Yorkshire. *Eur Urol* 43: 246-257.
54. Chahal R, Sundaram SK, Iddenden R, et al (2003) A study of the morbidity, mortality and long-term survival following radical cystectomy

and radical radiotherapy in the treatment of invasive bladder cancer in Yorkshire. *Eur Urol* 43: 246-257.

55. Fadl-Elmula I, Kytola S, Pan Y, et al. (2001) Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. *Int. J. Cancer* 92(6): 824-831.
56. Simon R, Burger H, Semjonow A, et al (2000) Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol.* 17(5): 1025-1029.
57. Nocito A, Bubendorf L, Maria Tinner E, et al (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194(3): 349-357.
58. Harris SL, Levine AJ. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* Apr 18;24(17):2899-2908.
59. Mittnacht S. (2005) The retinoblastoma protein--from bench to bedside. *Eur J Cell Biol.* Mar;84(2-3):97-107.
60. Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. (1981) Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan;78(1): 41-45.
61. Oren M, Levine AJ. (1983) Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan;80(1):56-59.
62. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* Jun 30;57(7):1083-1093.

63. Varley JM. (2003) Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat.* Mar;21(3): 313-320.
64. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. (2003) The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol.* Apr;169(4):1219-1228.
65. Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT, Danska JS. (1996) V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev.* Aug 15;10(16):2038-2054.
66. Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, Wahl GM. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.* Apr 15;10(8):934-947.
67. Massague J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* Nov 18;432(7015):298-306.
68. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* Jul 25;352(6333):345-347.
69. Johnson P, Chung S, Benchimol S. (1993) Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol.* Mar;13(3):1456-63.
70. Takahashi R, Hashimoto T, Xu HJ, Hu SX, Matsui T, Miki T, Bigo-Marshall, et al. (1991) The retinoblastoma gene functions as a growth



- and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(12):5257 – 5261.
71. Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, et al. (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51(20): 5736 – 5743.
  72. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez Benedict WF. (1992) Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84(16):1251 – 1256.
  73. Presti JC, Jr, Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, Jhanwar SC. (1991) Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res* 51(5):1544-1552.
  74. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, et al (1992) Altered expression of retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J.Natl. Cancer Inst.* 84(16):1251-1256.
  75. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-825
  76. Michieli P, Chedid M, Lin D, et al (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 54(13):3391-3395.
  77. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD et al. (1998) Effect of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression on tumor progression in bladder cancer . *J. Nat. Cancer Inst.* 90(14): 1072-1079.
  78. Lee CC, Yamamoto S, Morimura K, et al. (1997) Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. *Cancer* 79: 780-789.

79. Bringuier PP, Tamimi Y, Schuuring E, et al (1996) Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumors; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 12: 1747-1753.
80. Shin KY, Kong G, Kim WS et al. (1997) Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancer. *Br J Cancer* 75: 1788-1792.
81. Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, et al. (2001) Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and ki67. *Br J Cancer* 84(2): 270-275.
82. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC et al. (1999) Loss of cell cycle regulators p27(kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *Am J Pathol* 155(4): 1129-1136.
83. Kamai T, Takagi K, Asami H et al (2001) Decreasing of p27(kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 84(9): 1242-1251.
84. Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P (2000) H-RAS, K-RAS y N-RAS gene activation in human bladder cancer. *Cnacr Genet Cytogenet* 121(1): 73-77.
85. Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, et al. (1997) Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57(14):2860-2864.
86. Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. (1998) Patterns of chromosomal imbalances in advanced

urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.

Am J Pathol 153(5):1615-1621.

87. Ejarque MJ, Vicente M, Bernues M, Oliver A, Vicente J, Capella G, Lluís F, Chechile G. (1999) Restriction fragment length polymorphism of the L-myc gene is not a prognostic factor in bladder cancer patients. Br J Cancer 79(11-12):1855 –1858.
88. Kee KH, Lee MJ, Ro JY. (2001) Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder. Oncol Rep 8(3): 579 – 583.
89. Neal DE, Sharples L, Smith K, et al. (1985) Epidermal growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. Lancet 1: 366-368
90. Neal DE, Sharples L, Smith K, et al. (1990) The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. Cancer 65:1619-1625.
91. Messing EM. (1990) Clinical implications of the expression growth factor receptors in human transitional cell carcinomas. Cancer Res 50:2530-2537)
92. Bue P, Wester K, Sjöström A, Holmberg A, Nilsson S, Carlsson J, et al. (1998) Expression of epidermal growth factor receptor in urinary bladder cancer metastases. Int J Cancer;76(2):189-193.
93. Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, et al (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a multivariate survival analysis. Am J Clin Pathol 101: 166-176.

94. Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S, et al. (2000) C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* 55(5): 679-683.
95. Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ, et al (2001) Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 7(8): 2440-2447.
96. Lee SH, Lee JY, Park Ws et al. (1999) Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *BJU Int* 83(6): 698-702.
97. Bugajska U, Georgopoulos NT, Southgate J, et al. (2002) The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 94(18): 1381-1395.
98. Nakanishi K, Tominaga S, Hiroi S, et al. (2002) Expression of survivin does not predict survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 44(16): 559-563.
99. Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, et al. (2002) Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front Biosci* 7:e36-41.
100. Asci R, Yildiz L, Sarikaya S, et al (2001) p53 and bcl-2 overexpression as associated risk factors in patients 40 years old or less with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int* 67(1): 34-40.
101. Pollack A, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, et al (1997) Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 3(10):1823-1829.

102. Burger H, Nooter K, Boersma AW, et al. (1997) Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumor cell lines. *Int J Cancer* (United States) 73:592-599.
103. Birkenhake S, Martus P, Kühn R, et al. (1998 )Radiotherapy alone or radiochemotherapy with platin derivative following transurethral resection of the bladder. *Strahlenther Onkol*;174:121-127.
104. Sauer R, Birkenhake S, Kühn R, et al. (1998) Efficacy of radiochemotherapy with platin derivatives compared to radiotherapy alone in organ-sparing treatment of bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40:121-127.
105. D'Andrea AD, Yoshimura A, Youssoufian H, Zon LI, Koo JW, Lodish HF. (1991) The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains. *Mol Cell Biol*. Apr;11(4):1980-1987.
106. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. Jul 30;74(2):227-236.
107. He TC, Jiang N, Zhuang H, Quelle DE, Wojchowski DM. (1994) The extended box 2 subdomain of erythropoietin receptor is nonessential for Jak2 activation yet critical for efficient mitogenesis in FDC-ER cells. *J Biol Chem*. Jul 15;269(28):18291-18294.
108. Muthukumaran G, Kotenko S, Donnelly R, Ihle JN, Pestka S. (1997) Chimeric erythropoietin-interferon gamma receptors reveal differences

in functional architecture of intracellular domains for signal transduction.

J Biol Chem. Feb 21;272(8):4993-4999.

109. Sawyer ST, Penta K. (1996) Association of JAK2 and STAT5 with erythropoietin receptors. Role of receptor phosphorylation in erythropoietin signal transduction. J Biol Chem. Dec 13;271(50):32430-32437.
110. Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. (1998) Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. Blood. May 15;91(10):3734-3745.
111. Perona R, Sanchez-Perez I. (2004) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. Br J Cancer. Feb 9;90(3):573-577.
112. Tilbrook PA and Klinken SP. (1999) The erythropoietin receptor. Int J Biochem Cell Biol 31: 1001- 1005.
113. Boudot C, Petitfrere E, Kadri Z, Chretien S, Mayeux P, Haye B, Billat C. (1999) Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2). J Biol Chem. Nov 26;274(48):33966-33972.
114. Tilbrook PA, Bittorf T, Callus BA, Busfield SJ, Ingley E, Klinken SP. (1996) Regulation of the erythropoietin receptor and involvement of JAK2 in differentiation of J2E erythroid cells. Cell Growth Differ. Apr;7(4):511-520.
115. Bittorf T, Seiler J, Zhang Z, Jaster R, Brock J. (1999) SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and

- suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells. *Biol Chem.* Oct;380(10):1201-1209.
116. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A. (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood.* May 1;89(9):3148-3154.
  117. Farrell F, Lee A. (2004) The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist.*;9 Suppl 5:18-30.
  118. Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, Orntoft TF. (2003) Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet.* Jan;33(1):90-96.
  119. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. (2001) Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 18;98(26):15149-15154.
  120. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. (2002) Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis.* Nov;23(11):1797-1805.
  121. Ribatti D, Marzullo A, Nico B, Crivellato E, Ria R, Vacca A. Ribatti D, Marzullo A, Nico B, Crivellato E, Ria R, Vacca A. (2003) Histopathology. *Mar*;42(3):246-250.
  122. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. (2003) Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin

receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest.* Oct;83(10):1477-1487.

123. Dickinson A, Fox S, Persad R, et al. (1994) Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74: 762-766.
124. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. (1992) Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124.
125. Inoue K, Slaton JW, Karashima T, et al. (2000) The prognostic values of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res* 6(12): 4866-4873.
126. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, et al. (1995) Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 154(1): 69-71.
127. Chopin DK, Caruelle JP, Colombel M, et al. (1993) Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *J Urol* 150: 1126-1130.
128. Nguyen M, Watanabe H, Budson A, et al. (1993) Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 85: 241-242.
129. Brown L, Berse B, Jackman R, et al. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (VEGF) and its receptors in kidney and bladder cancers. *Am J Pathol* 143: 1255-1262.



130. Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O. (1997) Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder carcinoma. *Cancer* 79(6): 1190-1194.
131. Inoue K, Slaton JW, Perrotte P, et al. (2000) Interleukin-8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res* 60: 2290-2299.
132. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, et al. (1997) Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 57(23): 5281-5285.
133. Acs G, Xu X, Chu C, Acs P, Verma A. (2004) Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer*. Jun 1;100(11):2376-86.
134. Eccles TG, Patel A, Verma A, Nicholson D, Lukes Y, Tuttle RM, Francis GL. (2003) Erythropoietin and the erythropoietin receptor are expressed by papillary thyroid carcinoma from children and adolescents. Expression of erythropoietin receptor might be a favorable prognostic indicator. *Ann Clin Lab Sci*. Fall 33(4):411-422.
135. Hoogsteen IJ, Peeters WJ, Marres HA, Rijken PF, van den Hoogen FJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH. (2005) Erythropoietin receptor is not a surrogate marker for tumor hypoxia and does not correlate with survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol*. Aug 76(2):213-218.
136. Todokoro K, Kanazawa S, Amanuma H, Ikawa Y. (1987) Specific binding of erythropoietin to its receptor on responsive mouse erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 84(12):4126-4130.

137. Noguchi T, Fukumoto H, Mishina Y, Obinata M. (1987) Factors controlling induction of commitment of murine erythroleukemia (TSA8) cells to CFU-E (colony forming unit-erythroid). *Development*. Sep 101(1):169-74.
138. Weiss TL, Barker ME, Selleck SE, Wintroub BU. (1989) Erythropoietin binding and induced differentiation of Rauscher erythroleukemia cell line red 5-1.5. *J Biol Chem*. Jan 25 264(3):1804-1810.
139. Okuno Y, Suzuki A, Ichiba S, Takahashi T, Nakamura K, Hitomi K, Sasaki R, Tada K, Imura H. (1990) Establishment of an erythroid cell line (JK-1) that spontaneously differentiates to red cells. *Cancer*. Oct 1 66(7):1544-1551.
140. Kitamura T, Tojo A, Kuwaki T, Chiba S, Miyazono K, Urabe A, Takaku F. (1989) Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood*. Feb 73(2):375-380.
141. Ito E, Kasai M, Hayashi Y, Toki T, Arai K, Yokoyama S, Kato K, Tachibana N, Yamamoto M, Yokoyama M. (1995) Expression of erythroid-specific genes in acute megakaryoblastic leukaemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. *Br J Haematol*. Jul 90(3):607-614.
142. Takeshita A, Shinjo K, Higuchi M, Miyawaki S, Takemoto Y, Kishimoto Y, Saito K, Takuchi H, Kuriyama K, Kimura Y, Asou N, Takahashi M, Hotta T, Kanamaru A, Ueda R, Ohno R. (2000) Quantitative expression of erythropoietin receptor (EPO-R) on acute leukaemia cells: relationships between the amount of EPO-R and CD phenotypes, in vitro proliferative response, the amount of other cytokine receptors and

- clinical prognosis. Japan Adult Leukaemia Study Group. *Br J Haematol.* Jan 108(1):55-63.
143. Jeannesson P, Trentesaux C, Nyoung MN, Mayeux P, Jacquot R, Jardillier JC. (1991) Induction of erythropoietin receptors during aclacinomycin-mediated erythroid differentiation of K562 leukemia cells. *Leukemia.* Jan 5(1):14-18.
  144. Jeannesson P, Lahlil R, Chenais B, Devy L, Gillet R, Aries A, Morceau F, Trentesaux C. (1997) Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk Lymphoma.* Aug 26(5-6):575-587.
  145. Klinken SP, Nicola NA, Johnson GR. (1988) In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 85(22):8506-8510.
  146. Li JP, D'Andrea AD, Lodish HF, Baltimore D. (1990) Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature.* Feb 22 343(6260):762-764.
  147. Ruscetti SK, Janesch NJ, Chakraborti A, Sawyer ST, Hankins WD. (1990) Friend spleen focus-forming virus induces factor independence in an erythropoietin-dependent erythroleukemia cell line. *J Virol.* Mar 64(3):1057-1062.
  148. Yoshimura A, Longmore G, Lodish HF. (1990) Point mutation in the exoplasmic domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-

- independent activation and tumorigenicity. *Nature*. Dec 13 348(6302):647-649.
149. Lacombe C, Chretien S, Lemarchandel V, Mayeux P, Romeo PH, Gisselbrecht S, Cartron JP. (1991) Spleen focus-forming virus long terminal repeat insertional activation of the murine erythropoietin receptor gene in the T3Cl-2 friend leukemia cell line. *J Biol Chem*. Apr 15 266(11): 6952-6956.
  150. Hino M, Tojo A, Misawa Y, Morii H, Takaku F, Shibuya M. (1991) Unregulated expression of the erythropoietin receptor gene caused by insertion of spleen focus-forming virus long terminal repeat in a murine erythroleukemia cell line. *Mol Cell Biol*. Nov 11(11):5527-5533.
  151. Longmore GD, Lodish HF. (1991) An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine receptor superfamily oncogene. *Cell*. Dec 20 67(6):1089-1102.
  152. Chretien S, Moreau-Gachelin F, Apiou F, Courtois G, Mayeux P, Dutrillaux B, Cartron JP, Gisselbrecht S, Lacombe C. (1994) Putative oncogenic role of the erythropoietin receptor in murine and human erythroleukemia cells. *Blood*. Apr 1; 83(7):1813-1821.
  153. Okuno Y, Takahashi T, Suzuki A, Ichiba S, Nakamura K, Hitomi K, Sasaki R, Imura H. (1990) Expression of the erythropoietin receptor on a human myeloma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 16;170(3):1128-34.
  154. Feger F, Dubart A, Lacout C, Dusanter-Fourt I, Mayeux P, Vainchenker W, Dumenil D. (1997) Ectopic expression of the erythropoietin receptor in a murine interleukin-6-dependent plasmacytoma cell line (TEPC-

- 2027) confers proliferative responsiveness to erythropoietin. *Blood*. Jan 15; 89(2):435-445.
155. Kayser K, Gabius HJ. (1992) Analysis of expression of erythropoietin-binding sites in human lung carcinoma by the biotinylated ligand. *Zentralbl Pathol*. Sep; 138(4):266-270.
  156. Dagnon K, Pacary E, Commo F, Antoine M, Bernaudin M, Bernaudin JF, Callard P. (2005) Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res*. Feb 1; 11(3):993-999.
  157. Arcasoy MO, Amin K, Vollmer RT, Jiang X, Demark-Wahnefried W, Haroon ZA. (2005) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human prostate cancer. *Mod Pathol*. Mar; 18(3):421-430
  158. Brower V. (2003) Normal and neoplastic prostate cells have EPO receptors. *Lancet Oncol*. Feb; 4(2):69.
  159. Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B. (2000) Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res*. Oct; 10(5):421-426.
  160. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. (2003) Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol*. Jun; 162(6):1789-1806.
  161. Dillard DG, Venkatraman G, Cohen C, Delgaudio J, Gal AA, Mattox DE. (2001) Immunolocalization of erythropoietin and erythropoietin receptor in vestibular schwannoma. *Acta Otolaryngol*. Jan; 121(2):149-152.

162. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* May 1; 61(9):3561-3565.
163. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. (2002) Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer.* Sep 1; 95(5):969-981.
164. Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA. (2005) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clin Cancer Res.* Jan 1; 11(1):20-7.
165. Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ. (2004) Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett.* Oct 28; 214(2):243-251.
166. Nakamatsu K, Nishimura Y, Suzuki M, Kanamori S, Maenishi O, Yasuda Y. (2004) Erythropoietin/erythropoietin-receptor system as an angiogenic factor in chemically induced murine hepatic tumors. *Int J Clin Oncol.* Jun;9(3):184-8.
167. Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA, Haroon ZA. (2002) Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest.* Jul; 82(7):911-918.
168. Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, Zibera C, Novella A, Lucotti C, Della Cuna GR, Cazzola M. (1993) Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. *Haematologica.* Jul-Aug; 78(4):208-212.

169. Westphal G, Niederberger E, Blum C, Wollman Y, Knoch TA, Rebel W, Debus J, Friedrich E. (2002) Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality. *Tumori*. Mar-Apr; 88(2):150-159.
170. Wollman Y, Westphal G, Blum M, Simantov R, Blumberg S, Peer G, Chernihovsky T, Friedrich E, Iaina A. (1996) The effect of human recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line. *Life Sci*. 59(4): 315-322.
171. Rossler J, Stolze I, Frede S, Freitag P, Schweigerer L, Havers W, Fandrey J. (2004) Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem*. Sep 1; 93(1): 153-61.).
172. Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Gorlach A. (1999) Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *J Physiol*. Apr 15; 516 ( Pt 2): 343-352.
173. Westenfelder C, Baranowski RL. (2000) Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int*. Aug; 58(2): 647-657.
174. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. (2001) Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer*. Mar 23; 84(6): 836-843.
175. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. (2003) Erythropoietin regulates tumour growth of human

- malignancies. *Carcinogenesis*. 2003 Jun; 24(6):1021-1029. Erratum en *Carcinogenesis*. Sep; 24(9):1567.
176. Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Cournoyer D, Belzile JP, Souhami L, Devic S, Chow TY. (2004) Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther*. Dec; 3(12):1525-1532.
  177. Pajonk F, Weil A, Sommer A, Suwinski R, Henke M. (2004) The erythropoietin-receptor pathway modulates survival of cancer cells. *Oncogene*. Nov 25; 23(55):8987-8991.
  178. Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Metivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G. (2005) Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. *Oncogene*. Jan 27; 24(5):737-745.
  179. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. (2005) Correction of anaemia through the use of darbepoetin alfa improves chemotherapeutic outcome in a murine model of Lewis lung carcinoma. *Br J Cancer*. Jul 25; 93(2):224-232.
  180. Kumar SM, Acs G, Fang D, Herlyn M, Elder DE, Xu X. (2005) Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. *Am J Pathol*. Mar; 166(3): 823-830.
  181. McBroom JW, Acs G, Rose GS, Krivak TC, Mohyeldin A, Bell A, Verma A. (2005) Erythropoietin receptor function and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. Jul 25; [Epub ahead of print].
  182. Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. (2005) Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT



- signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. Jun 23; 24(27):4442-4449.
183. Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, Lai SY, Cohen N, Acs G, Verma A. (2005) Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. May; 7(5):537-543.
  184. Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. (2003) Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. Oct 18; 362(9392):1255-1260.
  185. *Curr Hematol Rep*. 2004 Mar;3(2):83-4. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):78-9; author reply 81-2. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):79-80; author reply 81-2. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):80-1; author reply 81-2. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):80; author reply 81-2. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):81; author reply 81-2. *Lancet*. 2004 Jan 3;363(9402):82. *Lancet*. 2004 Mar 20;363(9413):992-3; author reply 993. *Lancet*. 2004 Mar 20;363(9413):992; author reply 993. *Lancet*. 2004 Mar 20;363(9413):993-4.
  186. Portillo Martin JA, Val Bernal F, Martin Garcia B, Hernandez Rodriguez R, Gutierrez Banos JL, Correias Gomez MA, Garijo Ayenza F, Buelta Carrillo L, Fernandez Gomez JM, Concepcion Masip T. (1991) Prognostic factors in 243 transitional carcinomas of the bladder (I): clinical and macroscopic parameters of the tumor. *Arch Esp Urol*. Mar;44(2):151-158).

187. Thrasher JB, Frazier HA, Robertson JE, Dodge RK, Paulson DF. (1994) Clinical variables which serve as predictors of cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate. *Cancer*. Mar 15; 73(6):1708-1715.
188. Lipponen PK, Eskelinen M, Jauhiainen K, Terho R, Harju E. (1993) Clinical prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder. *Urol Int*. 50(4):192-197.
189. Takashi M, Murase T, Mizuno S, Hamajima N, Ohno Y. (1987) Multivariate evaluation of prognostic determinants in bladder cancer patients. *Urol Int*.;42(5): 368-374.
190. Matos T, Cufer T, Cervek J, Bornstnar S, Kragelj B, Zumer-Pregelj M. (2000) Prognostic factors in invasive bladder carcinoma treated by combined modality protocol (organ-sparing approach). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jan 15; 46(2):403-409.
191. Hatch TR, Barry JM. (1986) The value of excretory urography in staging bladder cancer. *J Urol*. Jan;135(1):49.
192. Kern WH. (1984) The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer*. Mar 1; 53(5):1185-1189.
193. Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J. (2000) Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*. Jan; 163(1): 73-78.
194. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Leibovich BC, Egan KS, Spotts BE, Bostwick DG. (1999) Survival of patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer*. Jun 1; 85(11): 2469-2474.

195. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, Hawkins IR. (1983) Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol.* Dec;130(6):1083-1086.
196. Angulo Cuesta J, Sanchez Chapado M, Dominguez P, Lopez JI, Flores N, Pontes EJ, Grignon DJ, Montie JE. (1996) Prognosis prediction in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder] *Arch Esp Urol.* May; 49(4):374-384.
197. Zieger K, Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K. (1998) Long-term survival of patients with bladder tumours: the significance of risk factors. *Br J Urol.* Nov;82(5): 667-672.
198. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K. (1998) Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res.* 26(4):235-41.
199. Chow NH, Tzai TS, Cheng HL, Chan SH, Lin JS. (1994) Urinary cytodiagnosis: can it have a different prognostic implication than a diagnostic test? *Urol Int.* 53(1):18-23.
200. Tut VM, Hildreth AJ, Kumar M, Mellon JK. Does voided urine cytology have biological significance? *Br J Urol.* 1998 Nov;82(5):655-9.
201. Zein TA, Milad MF. (1991) Urine cytology in bladder tumors. *Int Surg.* Jan-Mar 76(1):52-4.
202. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. (1992) Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer.* 29A(1):69-75.
203. Stavropoulos NE, Ioachim E, Hastazeris K, Goussia A, Agnantis NJ. (1998) Lymphocyte subsets in superficial bladder cancer: correlation

with biological activity of the tumours. *Anticancer Res.* May-Jun 18(3B):2037-2040.

204. Reyes E, Carballido J, Prieto A, Molto L, Manzano L, Alvarez-Mon M. (1997) T lymphocytes infiltrating the bladder wall of patients with carcinoma of urinary bladder are in vivo activated. *Eur Urol.* 31(4):472-477.
205. Housseau F, Zeliszewski D, Roy M, Paradis V, Richon S, Ricour A, Bougaran J, Prapotnich D, Vallancien G, Benoit G, Desportes L, Bedossa P, Hercend T, Bidart JM, Bellet D. (1997) MHC-dependent cytotoxicity of autologous tumor cells by lymphocytes infiltrating urothelial carcinomas. *Int J Cancer.* May 16; 71(4):585-594.
206. Herring JC, Kamat AM. (2004) Treatment of muscle-invasive bladder cancer: progress and new challenges. *Expert Rev Anticancer Ther.* Dec; 4(6):1047-1056.
207. Honma I, Masumori N, Sato E, Takayanagi A, Takahashi A, Itoh N, Tamagawa M, Sato MA, Tsukamoto T. (2004) Local recurrence after radical cystectomy for invasive bladder cancer: an analysis of predictive factors. *Urology.* Oct; 64(4):744-748.

**Figura 1** - Fig. 1 - El ciclo celular y su regulación por kinasas dependientes de ciclinas.

**Figura 2** - Mecanismo de acción de p53.

**Figura 3** - Señalización PI3K/AKT.

**Figura 4** - Modelo de 2 vías para la progresión del carcinoma de vejiga.

**Figura 5** - Positividad de p53

**Figura 6** -Positividad de c-erb-B2.

**Figura 7** - Señalización de EPOR.

**Figura 8** - Señalización de Ras/MAPK

**Figura 9** - Inmunotinción negativa de EPOR

**Figura 10** - Inmunotinción positiva de EPOR

**Figura 11** - Analisis de supervivencia en función la expresión de EPOR

**Figura 12** - Analisis de supervivencia en función la expresión de la presencia de hematuria.

**Figura 13** - Analisis de supervivencia en función la existencia de obstrucción uretral

**Figura 14** - Analisis de supervivencia en función la presencia de estructuras papilares.

**Figura 15** - Analisis de supervivencia en función la asociación de carcinoma in situ.

**Figura 16** - Analisis de supervivencia en función la asociación de displasia en la mucosa.

**Figura 17** - Analisis de supervivencia en función la observación de nidos de von Brunn.

**Figura 18** - Analisis de supervivencia en función la positividad de la citología.

**Figura 19** - Analisis de supervivencia en función la infiltración linfocitaria.

**Tabla 1** - Niveles de evidencia y de correlación de diversos factores de riesgo (exposición vs no exposición) del cáncer de vejiga.

**Tabla 2.-** Características globales de los pacientes y sus neoplasias.

**Tabla 3.-** Características clínicas de los pacientes y sus neoplasias.

**Tabla 4.-** Características patológicas de los pacientes y sus neoplasias.

**Tabla 5.-** Relación entre el estadio del tumor y las diferentes variables estudiadas en 75 pacientes de carcinoma de vejiga .

**Tabla 6.-** Relación entre expresión de EPOR y tiempo de recaída.

**Tabla 7** - Asociaciones entre la expresión de EPOR y otras variables.

**Tabla 8** - Asociaciones inversas entre la supervivencia global y diversas variables.

**Tabla 9** – Análisis de regresión de Cox EPOR vs hematuria

**Tabla 10** – Análisis de regresión de Cox EPOR vs obstrucción uretral

**Tabla 11** – Análisis de regresión de Cox EPOR vs estructura papilar.

**Tabla 12** – Análisis de regresión de Cox EPOR vs CIS asociado.

**Tabla 13** – Análisis de regresión de Cox EPOR vs displasia asociada

**Tabla 14**– Análisis de regresión de Cox EPOR vs positividad de la citología.

